



**Etude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales modèles chez *Saccharomyces cerevisiae* :
Analyses des relations structure/fonction du
transporteur d'ADP/ATP et de l'accessibilité au solvant
de la porine VDAC**

Benjamin Clemençon

► **To cite this version:**

Benjamin Clemençon. Etude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales modèles chez *Saccharomyces cerevisiae* : Analyses des relations structure/fonction du transporteur d'ADP/ATP et de l'accessibilité au solvant de la porine VDAC. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00577042

HAL Id: tel-00577042

<https://theses.hal.science/tel-00577042>

Submitted on 16 Mar 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Benjamin CLEMENÇON

Thèse dirigée par **Ludovic Pelosi**

préparée au sein du **Laboratoire Biochimie et Biophysique des
Systèmes Intégrés**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales modèles chez *Saccharomyces cerevisiae* :

Analyses des relations structure/fonction du transporteur
d'ADP/ATP et de l'accessibilité au solvant de la porine VDAC

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2010**,
devant le jury composé de :

M. Bruno MIROUX

Directeur de Recherche, I.B.P.C. Paris..... Rapporteur

M. Jean-Jacques LACAPERE

Directeur de Recherche, C.R.B3. Paris Rapporteur

Mme Sandrine SAGAN

Directeur de Recherche, L.B.M. Paris..... Membre

M. Franck FIESCHI

Professeur, I.B.S. Grenoble Président

M. Eric Forest

Directeur de Recherche, I.B.S. Grenoble..... Membre

M. Ludovic Pelosi

Maître de Conférences, L.B.B.S.I. Grenoble..... Membre



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Benjamin CLEMENÇON

Thèse dirigée par **Ludovic Pelosi**

préparée au sein du **Laboratoire Biochimie et Biophysique des
Systèmes Intégrés**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales modèles chez *Saccharomyces cerevisiae* :

Analyses des relations structure/fonction du transporteur
d'ADP/ATP et de l'accessibilité au solvant de la porine VDAC

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2010**,
devant le jury composé de :

M. Bruno MIROUX

Directeur de Recherche, I.B.P.C. Paris..... Rapporteur

M. Jean-Jacques LACAPERE

Directeur de Recherche, C.R.B3. Paris Rapporteur

Mme Sandrine SAGAN

Directeur de Recherche, L.B.M. Paris..... Membre

M. Franck FIESCHI

Professeur, I.B.S. Grenoble Président

M. Eric Forest

Directeur de Recherche, I.B.S. Grenoble..... Membre

M. Ludovic Pelosi

Maître de Conférences, L.B.B.S.I. Grenoble..... Membre



RESUME

Les transporteurs d'ADP/ATP (Ancp) et de phosphate inorganique (PiC) ainsi que la porine VDAC représentent les principaux maillons d'une machinerie macromoléculaire aboutissant au transport de l'ADP, de l'ATP et du Pi à travers la double membrane protéolipidique de la mitochondrie. Ainsi, ces trois protéines jouent un rôle clef dans le développement des organismes aérobies stricts. Malgré les nombreux résultats obtenus jusqu'à présent à l'aide d'approches biochimiques, structurales et de biologie moléculaire, les connaissances relatives à ces trois protéines sont loin d'être complètes et notamment les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les processus de transport ne sont pas parfaitement connus. Les difficultés rencontrées sont principalement liées à la localisation membranaire de ces protéines qui rend difficile leur étude. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces problèmes, nous avons donc décidé d'étudier ces protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où la génétique est facilitée.

Une majeure partie de ce projet a concerné la principale isoforme du transporteur d'ADP/ATP de levure (ScAnc2p) qui assure l'échange d'ADP cytosolique contre de l'ATP matriciel néosynthétisé suite aux processus de phosphorylation oxydative. Cette protéine peut être inhibée spécifiquement par deux poisons naturels, le carboxyatractyloside (CATR) et l'acide bongkréique (BA) qui stabilisent la protéine dans deux états conformationnels distincts adoptés au cours du mécanisme de transport. Afin de mieux comprendre cette dynamique, plusieurs études du transporteur ScAnc2p ont été réalisées à l'échelle de la protéine ou de quelques acides aminés en combinant des techniques d'analyses conformationnelles telles que l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS), la fluorescence intrinsèque des tryptophanes, l'immunodétection *in situ*, *etc.*, aux outils biochimiques directement liés à l'étude des Ancp. Nos résultats corroborent parfaitement l'hypothèse d'une structure malléable du transporteur et illustrent une réelle synergie entre le haut et le bas de la cavité, dans laquelle des changements conformationnels importants apparaissent lors du transport des nucléotides adényliques. Plus précisément, nous avons pu également montrer que l'extrémité C-terminale de ScAnc2p ainsi que le triplet de résidus méthionine conservé dans tout les Ancp seraient impliqués dans le transport des nucléotides *via* des changements conformationnels. D'autre part, ces travaux ont également permis d'obtenir les premières données d'accessibilité au solvant en HDX-MS du transporteur de Pi qui copurifie avec ScAnc2p. Enfin, dans une autre partie de ce travail, l'isoforme 1 de la porine de levure (ScVDAC1) a été purifiée en vue de son étude en HDX-MS. Malgré certains problèmes expérimentaux rencontrés, nous avons pu montrer que son accessibilité au solvant en solution de détergent était en accord avec les données structurales à hautes résolutions publiées récemment dans la littérature.

Mots clés : transporteur d'ADP/ATP, transporteur de phosphate, VDAC, CATR, BA, échange H/D, spectrométrie de masse, levure, *Saccharomyces cerevisiae*.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord François Boulay, de m'avoir accueilli pendant ces trois ans au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, de l'Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Sandrine Sagan et Messieurs Jean-Jacques Lacapere et Bruno Miroux pour avoir examiné avec soin ce manuscrit. Je remercie aussi Monsieur Franck Fieschi d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Gérard Brandolin et Ludovic Pelosi pour m'avoir formé à la recherche avec rigueur et compétence. Je tiens aussi à leur adresser mes remerciements pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées tant au niveau technique que fondamental.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Eric Forest, directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'Institut de Biologie Structurale, pour m'avoir permis d'effectuer une large partie de mes travaux au sein de son laboratoire et pour les nombreux conseils qu'il m'a apportés.

Je voudrais aussi remercier grandement Martial Rey pour m'avoir formé avec patience à la spectrométrie de masse, à la technique d'échange hydrogène/deutérium, et pour le rôle important qu'il a joué dans la réalisation de ces travaux.

Je remercie également les membres du laboratoire BBSI, notamment à Denis Rousseau et Claire Lesieur-Chungkham pour avoir apporté leur bonne humeur quotidiennement.

Je voudrais enfin remercier tous ceux qui m'ont soutenu de quelque façon que ce soit, en particulier ma famille et Audrey.

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : Introduction

I.1 La levure : un modèle de cellule eucaryote	4
I.2 La mitochondrie : l'organe de la respiration.....	7
I.2.1 Ultrastructure de la mitochondrie	7
I.2.2 Organisation moléculaire et supramoléculaire des mitochondries	10
I.2.3 Dynamique du compartiment mitochondrial	10
I.2.4 Fusion et fission mitochondriales	11
I.2.5 Rôle primordial dans la biosynthèse d'ATP	13
I.3 La machinerie mitochondriale du transport d'ADP, d'ATP et du Pi	15
I.3.1 Les transporteurs mitochondriaux.....	17
I.3.1.1 Le transporteur de phosphate PiC	19
I.3.1.1.1 Découverte et propriétés biochimiques du PiC.....	19
I.3.1.1.2 Mécanisme de transport du PiC mitochondrial.....	21
I.3.1.2 Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.....	22
I.3.1.2.1 Généralités	22
I.3.1.2.2 Les caractéristiques biochimiques du transport d'ADP/ATP	23
I.3.1.2.2.1 Le transport de nucléotides	23
I.3.1.2.2.2 Les inhibiteurs du transport d'ADP/ATP	23
I.3.1.2.2.2.1 Les atractylosides.....	25
I.3.1.2.2.2.2 Les acides bongkréiques	25
I.3.1.2.2.2.3 Les autres inhibiteurs	26
I.3.1.2.2.3 Aspects conformationnels du transporteur d'ADP/ATP.....	26
I.3.1.2.2.4 Etat oligomérique du transporteur d'ADP/ATP	28
I.3.1.2.3 Aspects structuraux du transporteur d'ADP/ATP.....	29
I.3.1.2.4 Les transporteurs d'ADP/ATP de levure (ScAnc2p).....	31
I.3.1.2.4.1 Les mutants de ScAnc2p.....	33
I.3.1.2.4.2 Les extrémités N/C-terminales de ScAnc2p	35
I.3.1.2.4.3 Les régions transmembranaires de ScAnc2p	36
I.3.1.2.4.4 Les boucles cytosoliques de ScAnc2p	37

I.3.1.2.4.5 Les boucles matricielles de ScAnc2p	37
I.3.1.2.4.6 Les différences conformationnelles entre les transporteurs bovins et de levures.....	40
I.3.1.2.4.7 Résumé des variations d'accessibilité des régions de ScAnc2p en fonction des inhibiteur CATR et BA.....	40
I.3.2 La porine VDAC.....	42
I.3.2.1 Identification et caractéristiques physiologiques de la porine	42
I.3.2.2 Les différents isoformes de la porine.....	43
I.3.2.3 Modèles de topologie de la porine dans la membrane.....	44
I.3.2.4 Structures 3D à hautes résolutions de la porine	47
I.3.2.4.1 Le canal transmembranaire en tonneau β	47
I.3.2.4.2 L'extrémité N-terminale de la porine.....	49
I.3.2.5 Les structures 3D de la porine sont elles natives ou non?	49
I.3.2.6 Le mécanisme moléculaire d'ouverture et fermeture du pore	51
I.3.2.6.1 L'implication du tonneau β	53
I.3.2.6.2 L'implication de l'extrémité N-terminale	53
I.3.2.6.3 Les régions « senseur » du voltage	54
I.3.2.7 La sélectivité du pore	59
I.3.2.7.1 Fixation des nucléotides et dérivés	60
I.3.2.7.2 Fixation des ions Ca^{2+}	60
I.3.2.7.3 Les partenaires protéiques présumés de la porine.....	61
I.3.2.8 Organisation supramoléculaire de la porine dans la membrane	61
I.3.2.9 Rôle des stéroïdes dans l'activité de la porine.....	63
I.4 Etude de l'accessibilité au solvant de protéines membranaires par échange H/D couplé à une analyse en spectrométrie de masse	63
I.4.1 Généralité sur l'échange hydrogène/deutérium	64
I.4.2 Le principe de l'échange hydrogène/deutérium.....	64
I.4.3 Marquage en continu des protéines en deutérium.....	66
I.4.4 Le problème du ré-échange du deutérium	67
I.4.5 L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine marquée au deuterium.....	68
I.4.6 Digestion de la protéine deutérée par des protéases acides	69
I.4.7 Analyse des produits de digestion à l'échelle peptidique	70
I.4.8 Analyses fines des zones deutérée à l'échelle de l'acide aminé	70
I.4.9 Les différentes cinétiques d'échange H/D	71

I.4.10 Les protéines membranaires en spectrométrie de masse	71
I.5 Problématique, objectifs et organisation du projet	75

PARTIE II : Matériels et Méthodes

II.1 Matériel biologique	81
II.1.1 Souches de levures et de bactéries.....	81
II.1.2 Conditions de culture et milieux utilisés (levures et bactéries).....	82
II.1.3 Détermination des courbes de croissance des levures	82
II.2 Techniques de biologie moléculaire	83
II.2.1 Plasmides utilisés.....	83
II.2.2 Amplification d'un fragment d'ADN par PCR	83
II.2.3 Digestion d'un brin d'ADN par des enzymes de restriction	84
II.2.4 Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	84
II.2.5 Préparation du plasmide (« miniprep »)	84
II.2.6 Ligature.....	85
II.2.7 Transformation levures/bactéries	85
II.2.7.1 Levures	85
II.2.7.2 Bactéries	85
II.2.8 Extraction d'un plasmide de levure (ce travail).....	86
II.2.9 Séquençage des inserts d'ADN	87
II.3 Techniques de biochimie.....	87
II.3.1 Dosage des protéines	87
II.3.2 Analyse des protéines par SDS-PAGE.....	87
II.3.3 Coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées par SDS-PAGE	88
II.3.4 Immunorévélation des protéines séparées par SDS-PAGE.....	88
II.3.5 Préparation des mitochondries de levure.....	89
II.3.6 Dosage des cytochromes mitochondriaux	91
II.3.7 Titration des sites de fixation de l' $[^3\text{H}]$ -ATR dans les mitochondries	91
II.3.8 Titration des sites CATR par fluorescence extrinsèque (N-ATR, N-ADP) dans les mitochondries	92
II.3.9 Titration des sites N-ADP dans les mitochondries	92

II.3.10 Titration des sites de fixation de l' [¹⁴ C]-ADP dans les mitochondries	93
II.3.11 Mesure de l'activité de transport ADP/ATP dans les mitochondries	93
II.3.12 Test d'accessibilité de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p en ELISA	94
II.3.13 Purification de ScAnc2p et mesure des changements de conformation de la protéine isolée par fluorescence intrinsèque des tryptophanes	94
II.3.14 Purification des complexes transporteur-inhibiteur pour l'étude en HDX-MS	95
II.3.15 Purification de ScAnc2p portant une étiquette polyhistidine	96
II.3.16 Digestion de ScAnc2p par des protéases acides	96
II.3.17 Deutération de ScAnc2p complexé à ses inhibiteurs	97
II.3.18 Purification rapide de la porine ScVDAC1	97
II.3.19 Purification de la porine ScVDAC1 portant une étiquette polyhistidine	98
II.3.20 Digestion de ScVDAC1 par la pepsine	98
II.3.21 Deutération de ScVDAC1 en solution de détergent	98
II.4 Techniques de spectrométrie de masse (SM)	99
II.4.1 Solvants et matériels utilisés lors des chromatographies liquides (LC) et des analyses en SM	99
II.4.2 Préparation des échantillons pour le MALDI	99
II.4.3 Montage de la ligne LC et élimination du détergent	99
II.4.4 Expérience de LC-MSMS	102
II.4.5 Analyse par LC-MS	102
II.4.5.1 Protéine entière	102
II.4.5.2 Protéine digérée	103
II.4.6 Analyse de la deutération des peptides	103

PARTIE III : Résultats

III.1 Les transporteurs d'ADP/ATP (ScAnc2p) et de phosphate (PiC) : Etudes conformationnelles et fonctionnelles	107
III.1.1 Article 1	107
A. Résumé	107
B. Résultats complémentaires non publiés	119

B.1 Les transporteurs Anc2p et Anc2p Δ Cter présente en solution une dynamique conformationnelle similaires vis-à-vis de ligands	119
B.2 Titration des sites BA par le 3'- <i>O</i> -naphtoyl-ADP (N-ADP)	120
B.3 Une délétion de l'extrémité C-terminale modifie négativement l'affinité apparente d'Anc2p pour le N-ADP	121
B.4 Propriétés phénotypique de la souche W316.....	122
III.1.2 Article 2	123
A. Résumé	123
B. Résultats non publiées	157
B.1 L'accessibilité au solvant du transporteur PiC est insensible au CATR et au BA.....	157
B.2 Premier résultats sur l'accessibilité au solvant du transporteur PiC en HDX-MS	160
III.2 La porine de Levure VDAC (ScVDAC1) : Etude <i>in vitro</i> de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse.....	165
III.2.1 Purification de la porine ScVDAC1 dans des conditions compatibles avec son étude en HDX-MS.....	165
III.2.1.1 Détermination de la masse précise de ScVDAC1	165
III.2.1.2 Mise aux points des conditions optimales d'extraction et de purification de la porine ScVDAC1	167
III.2.1.3 Dosage de l'ergostérol dans les fractions de porine ScVDAC1 purifiée .	170
III.2.1.4 Détermination des conditions de protéolyse de la porine ScVDAC1p	170
III.2.1.5 Criblage de nouveaux détergents compatibles avec l'analyse en HDX-MS	171
III.2.2 Etude de la porine SCVDAC1 en HDX-MS.....	173
III.2.2.1 Carte peptidique de la porine ScVDAC1 purifiée en C ₈ E ₄ ou C ₁₀ E ₆	173
III.2.2.2 Analyse de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 en HDX-MS	178

PARTIE IV : Discussion générale

IV. 1 Etude conformationnelle et fonctionnelle du transporteur ScAnc2p	182
---	------------

IV. 2 L'HDX-MS : une nouvelle méthode complémentaire d'analyse conformationnelle en biologie structurale étendue aux protéines membranaires	189
IV.2.1 Etude des transporteurs mitochondriaux de <i>S. cerevisiae</i>	190
IV.2.2 Etude de la porine VDAC1 de <i>S. cerevisiae</i>	192
Conclusions & perspectives	193

PARTIE V : Bibliographie.....	195
--------------------------------------	------------

PARTIE VI : Travaux annexes

Index des illustrations

FIGURES

Figure I.1 : Le bourgeonnement : un mode de division chez <i>S. cerevisiae</i>	5
Figure I.2 : La levure <i>S. cerevisiae</i> , une cellule modèle présentant les mêmes caractéristiques cytologiques qu'une cellule eucaryote animale mais comportant un mode de division particulier	5
Figure I.3 : Organisation générale d'une mitochondrie	8
Figure I.4 : Les mitochondries de <i>S. cerevisiae</i>	12
Figure I.5 : Réticulum mitochondrial dynamique	12
Figure I.6 : Les transferts d'électrons dans la membrane interne des mitochondries	14
Figure I.7 : Modèle de machinerie de transport actif actionné par le gradient électrochimique de protons à travers la double membrane mitochondriale	16
Figure I.8 : Modèle d'un membre de la MCF déduit de la structure 3D du complexe transporteur bovin (bAnc1p)	18
Figure I.9 : Modèle simplifié de la machinerie d'import des protéines mitochondriales de <i>S. cerevisiae</i> en particulier la porine VDAC et les transporteurs mitochondriaux	20
Figure I.10 : Structure chimique des principales molécules interagissant avec le transporteur de Pi	24
Figure I.11 : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP	24
Figure I.12 : Etats conformationnels adoptés par l'Ancp	27
Figure I.13 : Structure 3D du complexe bAncp-CATR	30
Figure I.14 : Détails structuraux du complexe bAnc1p-CATR	30
Figure I.15 : Alignement des séquences primaires des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p	32
Figure I.16 : Modèle représentant le changement de conformation de la boucle m2 de ScAnc2p en complexe avec le CATR ou le BA	39
Figure I.17 : Données d'accessibilité des différentes zones du transporteur de levure en fonction des inhibiteurs présents (CATR et BA)	41
Figure I.18 : Différents modèles topologiques proposés pour les porines mitochondriales	46
Figure I.19 : Structures des porines VDAC1 mitochondriales	48
Figure I.20 : Modèle de repliement dans la membrane externe mitochondriale du VDAC1 humain	52
Figure I.21 : Structures et états de charges des porines mitochondriales de mammifères vue de l'espace cytosolique	57
Figure I.22 : Identifications des différents hydrogènes présents dans la structure primaire d'une chaîne polypeptidique quelconque capables ou non de s'échanger avec le solvant (D ₂ O)	65
Figure I.23 : Influence du pH sur la constante d'échange H/D d'une chaîne de poly-alanine.	66

Figure I.24 : Principe de l'échange Hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) pour la méthode de marquage en continu des protéines	67
Figure I.25 : Différents modèles d'échange d'hydrogènes.....	72
Figure I.26 : Modèle du mécanisme de transport de l'ADP proposé suite à l'analyse du transporteur bAnc1p en HDX-MS.....	77
~~~~~	
<b>Figure II.1 :</b> Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de levure.....	<b>90</b>
<b>Figure II.2 :</b> Principe du dosage de l'ATP par le système luciférine-luciférase .....	<b>94</b>
<b>Figure II.3 :</b> Montage de la ligne de LC pour son utilisation en DXMS.....	<b>101</b>
~~~~~	
Figure III.1.1 : Cinétique de la variation de fluorescence intrinsèque des transporteurs Anc2p et Anc2pΔCter.....	120
Figure III.1.2 : Etude de la fixation du N-ADP sur les transporteurs Anc2p et Anc2pΔCter	121
Figure III.1.3 : Analyse phénotypique de la souche de levure <i>JLIΔ2Δ3u⁻</i> (dépourvue de transporteur d'ADP/ATP endogène) transformée par les plasmides pMDANC2-3Y (souche <i>K317-ΔW</i>) et pMDANC2-3Y-W316 (souche W316) exprimant respectivement les transporteurs Anc2pΔW et Anc2p3Y-W316...	122
~~~~~	
<b>Figure III.1.4 :</b> Alignement des séquences des transporteurs ScAnc2p et PiC (isoforme 1) de la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>158</b>
<b>Figure III.1.5 :</b> Spectre de masse obtenus en ESI-ToF-MS avant (vert) et après deutération de régions peptidiques caractéristiques du transporteur PiC et du transporteur ScAnc2p après incubation en présence de CATR (Rouge) ou de BA (noir) .....	<b>159</b>
<b>Figure III.1.6 :</b> Carte peptidique du transporteur PiC digéré par la pepsine immobilisée .....	<b>161</b>
<b>Figure III.1.7 :</b> Modélisation du transporteur PiC à partir des données structurale du transporteur d'ADP/ATP bovin (bAnc1p) via le programme PHYRE.....	<b>162</b>
<b>Figure III.1.8 :</b> Cinétique de deutération des régions peptidiques du transporteur PiC analysées en LC-ESI-ToF-MS.....	<b>163</b>
<b>Figure III.1.9 :</b> Cinétique de deutération de la région peptidique 158-168 à 20°C après 10, 100 et 10000s d'HDX.....	<b>164</b>
<b>Figure III.2.1 :</b> Détermination de la masse précise de ScVDAC1-(His ₆ ) en solution de DDM 0,05% (p/v) par analyse en LC ESI-ToF-MS. ....	<b>166</b>
<b>Figure III.2.2 :</b> Purification en une seule étape de la porine ScVDAC1p en HECAMEG par chromatographie sur colonne d'HTP .....	<b>168</b>

<b>Figure III.2.3 :</b> Détermination du rapport minimal de la quantité de détergent (HECAMEG) sur la quantité de protéine dans le lysat mitochondrial à utiliser pour purifier la porine ScVDAC1p par chromatographie sur colonne d’HTP .....	<b>169</b>
<b>Figure III.2.4 :</b> Optimisation du protocole de purification de la porine ScVDAC1 en HECAMEG par chromatographie sur une colonne d’HTP .....	<b>169</b>
<b>Figure III.2.5 :</b> Protéolyse de la porine ScVDAC1p en conditions acide et à basse température par la pepsine et la rhizopuspepsine.....	<b>171</b>
<b>Figure III.2.6 :</b> Criblage de détergents compatibles avec l’analyse en HDX-MS de la porine ScVDAC1 .....	<b>172</b>
<b>Figure III.2.7 :</b> Purification du ScVDAC1 solubilisé en C ₁₀ E ₆ par chromatographie sur une colonne d’HTP .....	<b>173</b>
<b>Figure III.2.8 :</b> Carte peptidique de la porine ScVDAC digéré par la pepsine immobilisée.....	<b>175</b>
<b>Figure III.2.9 :</b> Profil d’élution HPLC des peptides (ionisés) obtenus à l’issue de la protéolyse et analyse des pics d’élution en ESI-ToF-MS .....	<b>176</b>
<b>Figure III.2.10 :</b> Cinétique de deutération des régions peptidiques de la porines ScVDAC analysées en LC-ESI-ToF-MS.....	<b>177</b>

~~~~~

| | |
|--|------------|
| Figure IV.1 : Organisation hypothétique dans la membrane interne mitochondriale de l’unité de transport des nucléotides adényliques | 185 |
|--|------------|

TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| Tableau I.1 : Récapitulatif des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur ScAnc2p | 34 |
| Tableau I.2 : Estimations du diamètre du pore au cours de ces 30 dernières années | 50 |
| Tableau I.3 : Résidus impliqués ou non dans le mécanisme d’ouverture et de fermeture du canal dépendant du voltage..... | 56 |
| Tableau I.4 : Les différents partenaires présumés du VDAC | 62 |

~~~~~

<b>Tableau II.1 :</b> Récapitulatif du génotype des souches de levures utilisées .....	<b>81</b>
<b>Tableau II.2 :</b> Récapitulatif du génotype des souches de bactéries <i>E. coli</i> .....	<b>82</b>
<b>Tableau II.3 :</b> Nature et dilution des anticorps primaires utilisés .....	<b>89</b>

## **EQUATIONS**

<b>Equation de correction du contre-échange .....</b>	<b>68</b>
-------------------------------------------------------	-----------



# PRINCIPALES ABREVIATIONS

<b>ADP</b>	: Adénosine diphosphate
<b>ATP</b>	: Adénosine triphosphate
<b>Ancp</b>	: Transporteur d'ADP/ATP mitochondrial
<b>ATR</b>	: Atractyloside
<b>bANC1</b>	: Gène codant l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin
<b>bAnc1p</b>	: Isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial bovin
<b>BCA</b>	: Acide bicinchoninique
<b>BSA</b>	: Albumine sérique bovine
<b>CATR</b>	: Carboxyatractyloside
<b>C₈E₄</b>	: Tetra éthylène glycol mono-octyl ether
<b>C₁₀E₆</b>	: Hexa éthylène glycol monodécyl ether
<b>DCM</b>	: Dichlorométhane
<b>HDX-MS</b>	: Echange Hydrogène/deutérium couplé à une analyse en spectrométrie de masse
<b>EMA</b>	: Eosine-5-maléimide
<b>ESI</b>	: Ionisation par électrospray
<b>HECAMEG</b>	: 6-O-(N-heptylcarbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside
<b>HTP</b>	: Hydroxyapatite
<b>HVDAC1</b>	: Isoforme 1 de la porine mitochondriale humaine
<b>LAPAO</b>	: 3-lauryl-amido-N,N'-diméthylamino-propylamine oxide
<b>LDAO</b>	: Lauryldiméthylamine-N-oxide
<b>MALDI</b>	: Désorption-ionisation laser assistée par matrice
<b>MS</b>	: Spectrométrie de masse
<b>NEM</b>	: N-Ethylmaléimide
<b>PiC</b>	: Transporteur de phosphate
<b>ScANC2</b>	: Gène codant l'isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de la
levure <i>S. cerevisiae</i>	
<b>ScAnc2p</b>	: Isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de la levure <i>S.</i>
<i>cerevisiae</i>	
<b>ScVDAC1</b>	: Isoforme 1 de la porine mitochondriale de la levure <i>S. cerevisiae</i>
<b>ToF</b>	: Temps de vol





# Partie I

## Introduction

### Sommaire

---

<b>I.1 La levure : un modèle de cellule eucaryote .....</b>	<b>4</b>
<b>I.2 La mitochondrie : l'organite de la respiration.....</b>	<b>7</b>
I.2.1 Ultrastructure de la mitochondrie .....	7
I.2.2 Organisation moléculaire et supramoléculaire des mitochondries .....	10
I.2.3 Dynamique du compartiment mitochondrial .....	10
I.2.4 Fusion et fission mitochondriales .....	11
I.2.5 Rôle primordial dans la biosynthèse d'ATP .....	13
<b>I.3 La machinerie mitochondriale du transport d'ADP, d'ATP et du Pi .....</b>	<b>15</b>
I.3.1 Les transporteurs mitochondriaux.....	17
I.3.1.1 Le transporteur de phosphate PiC .....	19
I.3.1.1.1 Découverte et propriétés biochimiques du PiC.....	19
I.3.1.1.2 Mécanisme de transport du PiC mitochondrial.....	21
I.3.1.2 Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial.....	22
I.3.1.2.1 Généralités .....	22
I.3.1.2.2 Les caractéristiques biochimiques du transport d'ADP/ATP .....	23
I.3.1.2.2.1 Le transport de nucléotides .....	23

I.3.1.2.2.2 Les inhibiteurs du transport d'ADP/ATP .....	23
I.3.1.2.2.2.1 Les atractylosides .....	25
I.3.1.2.2.2.2 Les acides bongkréiques .....	25
I.3.1.2.2.2.3 Les autres inhibiteurs .....	26
I.3.1.2.2.3 Aspects conformationnels du transporteur d'ADP/ATP.....	26
I.3.1.2.2.4 Etat oligomérique du transporteur d'ADP/ATP .....	28
I.3.1.2.3 Aspects structuraux du transporteur d'ADP/ATP.....	29
I.3.1.2.4 Les transporteurs d'ADP/ATP de levure (ScAnc2p).....	31
I.3.1.2.4.1 Les mutants de ScAnc2p.....	33
I.3.1.2.4.2 Les extrémités <i>N/C</i> -terminales de ScAnc2p .....	35
I.3.1.2.4.3 Les régions transmembranaires de ScAnc2p .....	36
I.3.1.2.4.4 Les boucles cytosoliques de ScAnc2p .....	37
I.3.1.2.4.5 Les boucles matricielles de ScAnc2p .....	37
I.3.1.2.4.6 Les différences conformationnelles entre les transporteurs bovins et de levures .....	40
I.3.1.2.4.7 Résumé des variations d'accessibilité des régions de ScAnc2p en fonction des inhibiteur CATR et BA.....	40
I.3.2 La porine VDAC.....	42
I.3.2.1 Identification et caractéristiques physiologiques de la porine .....	42
I.3.2.2 Les différents isoformes de la porine.....	43
I.3.2.3 Modèles de topologie de la porine dans la membrane.....	44
I.3.2.4 Structures 3D à hautes résolutions de la porine .....	47
I.3.2.4.1 Le canal transmembranaire en tonneau $\beta$ .....	47
I.3.2.4.2 L'extrémité <i>N</i> -terminale de la porine.....	49
I.3.2.5 Les structures 3D de la porine sont elles natives ou non? .....	49
I.3.2.6 Le mécanisme moléculaire d'ouverture et fermeture du pore .....	51
I.3.2.6.1 L'implication du tonneau $\beta$ .....	53
I.3.2.6.2 L'implication de l'extrémité <i>N</i> -terminale .....	53
I.3.2.6.3 Les régions « senseur » du voltage .....	54
I.3.2.7 La sélectivité du pore .....	59
I.3.2.7.1 Fixation des nucléotides et dérivés .....	60
I.3.2.7.2 Fixation des ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	60
I.3.2.7.3 Les partenaires protéiques présumés de la porine.....	61
I.3.2.8 Organisation supramoléculaire de la porine dans la membrane .....	61

I.3.2.9 Rôle des stérols dans l'activité de la porine.....	63
<b>I.4 Etude de l'accessibilité au solvant de protéines membranaires par échange H/D couplé à une analyse en spectrométrie de masse .....</b>	<b>63</b>
I.4.1 Généralité sur l'échange hydrogène/deutérium .....	64
I.4.2 Le principe de l'échange hydrogène/deutérium.....	64
I.4.3 Marquage en continu des protéines en deutérium.....	66
I.4.4 Le problème du ré-échange du deutérium .....	67
I.4.5 L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine marquée au deuterium.....	68
I.4.6 Digestion de la protéine deutérée par des protéases acides .....	69
I.4.7 Analyse des produits de digestion à l'échelle peptidique .....	70
I.4.8 Analyses fines des zones deutérée à l'échelle de l'acide aminé .....	70
I.4.9 Les différentes cinétiques d'échange H/D .....	71
I.4.10 Les protéines membranaires en spectrométrie de masse .....	71
<b>I.5 Problématique, objectifs et organisation du projet .....</b>	<b>75</b>

---

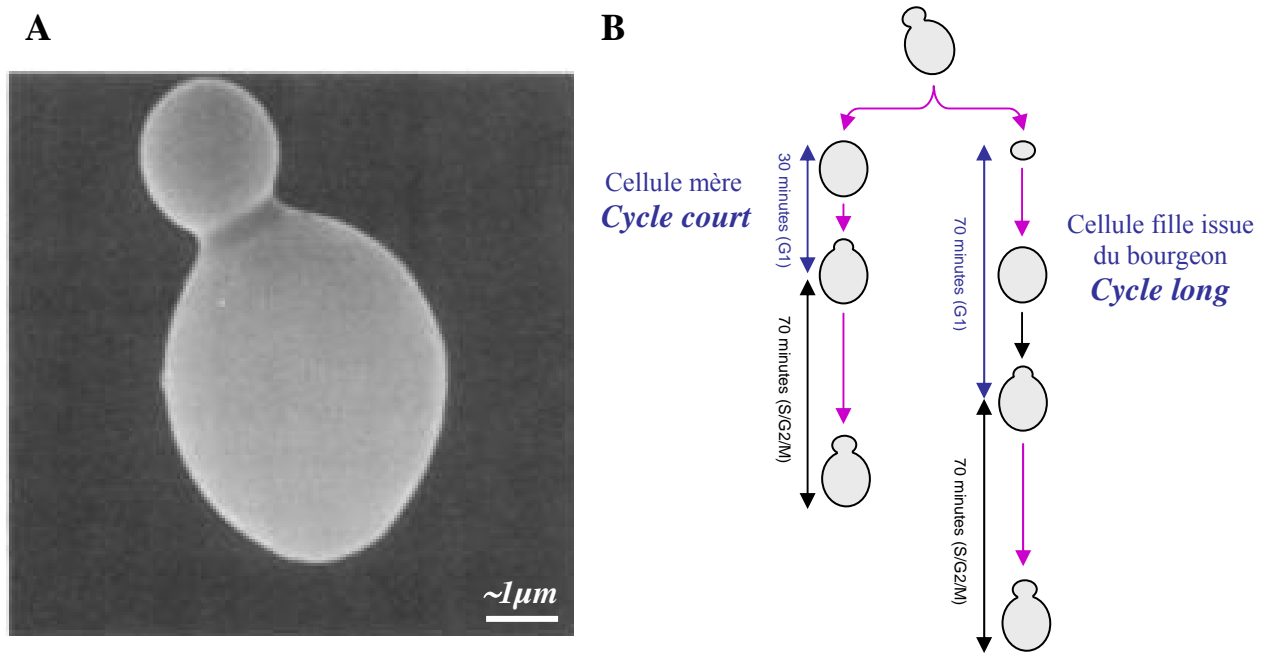
## Préambule

Bien que les cellules présentent des morphologies et des structures différentes, que leur rôle dans les divers organismes soit très varié, leur fonctionnement de base reste très similaire. L'une des principales activités de la cellule est de garantir sa propre survie. Afin d'assurer leurs fonctions biologiques, les cellules obtiennent de l'énergie en hydrolysant un métabolite hautement énergétique, l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique (Pi). L'ATP représente à l'échelle cellulaire une véritable monnaie d'échange énergétique utilisable. Chez les cellules eucaryotes aérobies, la synthèse d'ATP est majoritairement réalisée au sein des mitochondries, suite au processus de phosphorylation oxydative. Les mitochondries jouent donc un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire. Parmi les organismes modèles étudiés en biologie depuis plusieurs décennies, la levure *Saccharomyces cerevisiae* s'est distinguée pour sa facilité d'utilisation, sa génétique simplifiée par rapport aux eucaryotes supérieurs et son métabolisme alternatif basé sur la respiration ou la fermentation. Ainsi *S. cerevisiae* est actuellement utilisée pour étudier les différentes voies métaboliques cellulaires et en particulier celles impliquant la mitochondrie.

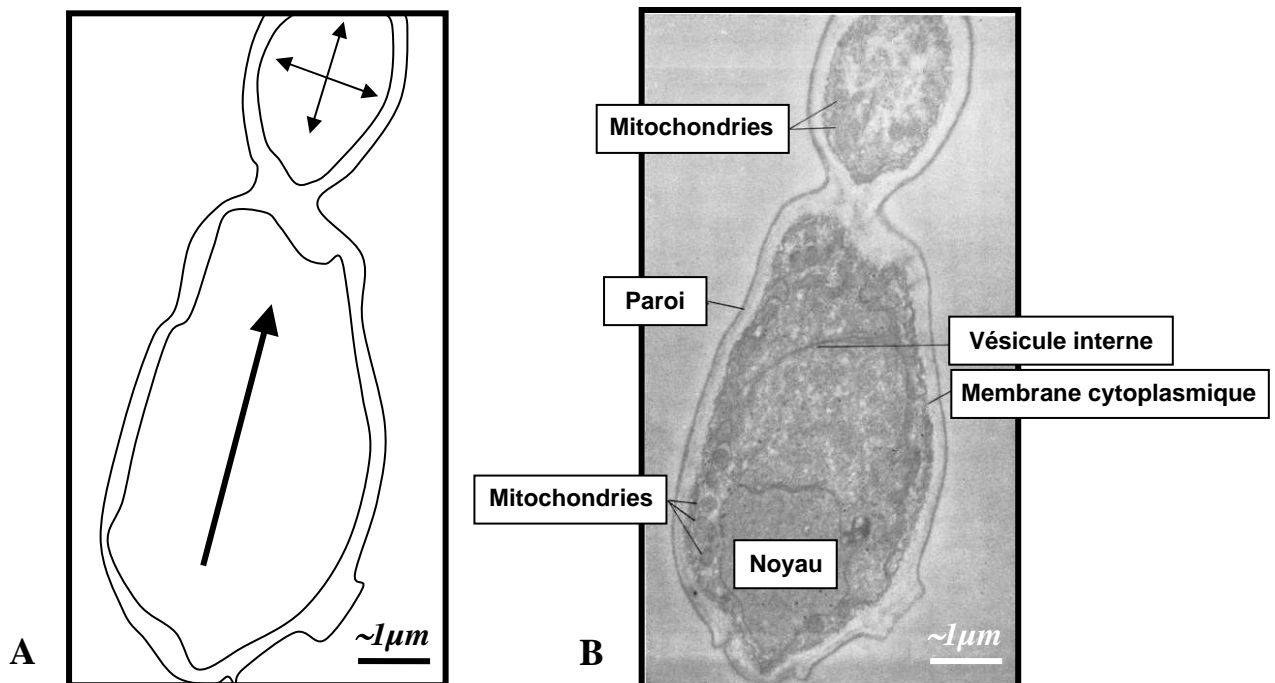
### I.1 La levure : un modèle de cellule eucaryote

Les biologistes appellent « Levure » l'ensemble des champignons monocellulaires. Leur cycle sexuel, fondé sur la production de quatre spores méiotiques contenues dans un asque, les classe sans ambiguïté parmi les champignons appartenant au phylum des ascomycètes. Parmi elles, la levure *S. cerevisiae*, la plus connue utilisée par les boulangers, brasseurs ou vignerons, constitue le principal modèle biologique utilisé dans ce travail de thèse. Il s'agit d'un modèle de choix puisqu'il constitue le premier eucaryote dont le génome ait été intégralement séquencé en 1996 et dont l'analyse génétique a atteint au cours des cinquante dernières années une puissance inégalée par rapport aux autres grands modèles biologiques.

En microscopie, *S. cerevisiae* se présente sous la forme de cellules oblongues à bourgeonnement asymétrique (**Figure I.1A**). Ce mode de division assez exceptionnel chez les eucaryotes crée une différence dans la durée individuelle des cycles. En effet, le bourgeon est plus petit que la cellule mère à l'issue de la division, ce qui implique une période de croissance plus longue avant qu'il ne produise lui-même un nouveau bourgeon, faute de quoi les cellules deviendraient plus petites à chaque division. Pour éviter une telle « catastrophe



**Figure I.1 : Le bourgeonnement : un mode de division chez *S. cerevisiae*.** (A) Photo en microscopie optique de *S. cerevisiae* en division asymétrique par bourgeonnement au grossissement 6000X (Herskowitz, 1988) (B) Schéma du cycle cellulaire de division par bourgeonnement mettant en évidence le cycle long (bourgeon) et le cycle court (cellule mère). Ce cycle comprend, la phase M, qui englobe les diverses étapes de la division nucléaire (mitose) et de division cytoplasmique (cytocinèse). La période entre deux phases M s'appelle l'interphase qui se compose de la phase S de réplication de l'ADN et deux phases intermédiaires, G1 et G2 (pour « Gap » ou « intervalle »). Ces deux dernières étapes donnent du temps supplémentaire pour la croissance cellulaire.



**Figure I.2 : La levure *S. cerevisiae*, une cellule modèle présentant les mêmes caractéristiques cytologiques qu'une cellule eucaryote animale mais comportant un mode de division particulier.** (A) Représentation schématisée à partir de la photographie B de la croissance par bourgeonnement d'une levure. La croissance est fortement polarisée et sa direction (flèche) est définie par l'expansion du cytosquelette d'actine. (B) Photographie en microscopie électronique d'une levure *S. cerevisiae* en bourgeonnement au grossissement 18 000X (Agar et Douglas, 1957) et annotation de ces divers composants cytosoliques.

mitotique », la cellule issue du bourgeon a donc une phase pré-réplivative (G1) plus longue (70 min) que celle de la cellule mère (30 min), et ne déclenche la réplication de son ADN (qui coïncide à peu près avec la formation du nouveau bourgeon) que lorsqu'elle a atteint une taille critique appropriée (**Figure I.1B**). La phase S (20 min) et les phases G2 et M (50 min) complètent le cycle, de sorte que le bourgeon et la cellule mère ont, respectivement, un cycle de division long (140 min) et court (100 min), avec une valeur moyenne de 120 min pour l'ensemble de la population cellulaire (**Figure I.1B**). La cellule croît dans les trois dimensions, avec toutefois un axe majeur de croissance (**Figure I.2A**). Son style de vie monocellulaire, sa croissance rapide sur des milieux définis, la facilité avec laquelle on peut obtenir et analyser génétiquement des mutants, leur proximité avec le règne animal amplement démontrée par des données de séquençage, concourent à en faire un modèle de premier plan pour l'étude de l'espèce humaine.

L'intérêt d'utiliser les levures comme modèle biologique est apparu dans les années 50, alors que les progrès de la microscopie avait déjà clairement établi la dichotomie entre les organismes cellulaires avec et sans noyau, c'est-à-dire entre eucaryotes et procaryotes selon une distinction introduite par le microbiologiste Edouard Chatton (1937). Au-delà du noyau, la structure hautement organisée de la cellule eucaryote est principalement caractérisée par la présence d'organites possédant leur propre génome (mitochondries et chloroplastes) ou dépourvus de génome (peroxysomes), par un système vésiculaire de sécrétion comportant le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, les endosomes et le lysosome (vacuole), par un cytosquelette d'actine et microtubulaire et enfin par l'organisation linéaire des chromosomes et leur transmission fondée sur l'appareil mitotique et méiotique. Les cellules de levure ont tous les attributs des eucaryotes (**Figure I.2B**), mais se distinguent des cellules végétales ou animales par leur petite taille. Celle-ci est très avantageuse pour des organismes monocellulaires dépourvus de photosynthèse et sans mobilité propre car elle augmente le rapport surface/volume et facilite donc les échanges nutritifs avec le milieu.

L'une des particularités métaboliques de *S. cerevisiae* est d'être capable de vivre en présence (aérobie), comme en absence (anaérobie) d'oxygène. Cette levure peut ainsi régénérer son ATP *via* deux modes énergétiques différents en fonction du milieu nutritif ambiant fermentescible (glucose, fructose, galactose, etc.) ou non fermentescible (éthanol, glycérol, lactate, etc.). Comme les molécules d'ATP ne sont pas stockées, son renouvellement doit être assuré soit par synthèse au niveau des mitochondries lors du processus de respiration cellulaire chez les organismes hétérotrophes comme *S. cerevisiae* en présence d'oxygène (aérobiose), ou bien par fermentation en absence d'oxygène (anaérobiose). Il est intéressant de noter que la fermentation débute par la

glycolyse qui est la première phase du catabolisme des sucres, commune à la fermentation et la respiration. Ces deux types de métabolisme diffèrent notamment par leur efficacité énergétique puisque l'énergie fournie par une mole de glucose lors de la fermentation ne représente que 5 à 6% de celle fournie par la respiration. C'est pourquoi la quasi-totalité des eucaryotes non photosynthétiques privilégient la respiration en présence d'oxygène. Cette adaptation est appelée effet Pasteur. *S. cerevisiae* échappe à cet effet, puisque même en présence d'oxygène, elle privilégie la fermentation, c'est l'effet « Crabtree ». En résumé, *S. cerevisiae* est aérobie facultative et occupe de ce point de vue une niche biologique très particulière. En outre, cette levure discrimine les sucres qu'elle est capable de fermenter et privilégie fortement le glucose à d'autres substrats fermentescibles. Il s'agit donc d'un effet glucose ou répression catabolique carbonée.

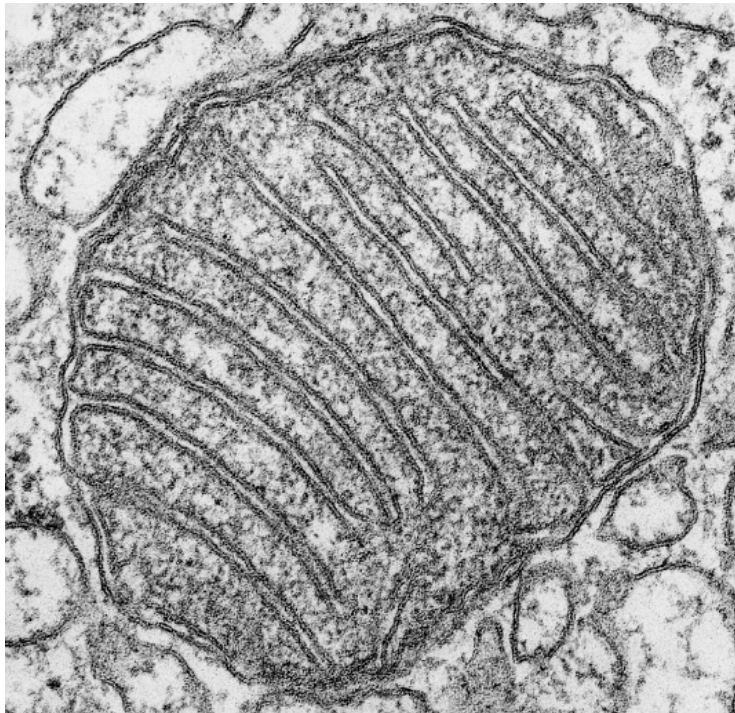
## **I.2 La mitochondrie : l'organite de la respiration**

La mitochondrie est l'organite cellulaire de la respiration par excellence issue d'un phénomène de symbiose réalisé il y a 1,5 milliards d'années entre une bactérie pourpre ( $\alpha$ -protéobactérie) et une cellule protoeucaryotique (une bactérie anaérobie proche des archaeobactéries). Ce phénomène évolutif a probablement permis à la cellule hôte de survivre en conditions aérobies grâce à l'acquisition d'une chaîne respiratoire. Les mitochondries contribuent à environ 20% du poids sec des levures et contiennent près d'un millier de protéines différentes. Elles sont donc comparables au noyau pour ce qui est de la complexité de leur composition protéique. Elles ont leur propre génome, mais celui-ci ne code qu'une fraction minime des protéines mitochondriales telles que certaines parties des complexes de la chaîne respiratoire et des enzymes du cycle de Krebs. La très grande majorité des protéines mitochondriales qui est synthétisée dans le cytoplasme est adressée aux mitochondries par un mécanisme qui est désormais assez bien connu grâce notamment aux études réalisées chez *S. cerevisiae*.

### **I.2.1 Ultrastructure de la mitochondrie**

Les études pionnières de Palade et Sjöstrand dans les années 1950 ont permis d'établir un modèle de structure des mitochondries qui est toujours d'actualité (**Figure I.3**) (Ernster et Schatz, 1981; Tzagoloff, 1982).





100 nm

**La membrane externe** peu sélective, forme une enveloppe et comporte plusieurs protéines dont la plus abondante est appelée porine ou VDAC qui forme de gros canaux remplis d'eau au travers de la bicouche lipidique laissant passer les molécules de moins de 5000 daltons. Il en résulte que l'espace intermembranaire a une composition très proche de celle du cytoplasme.

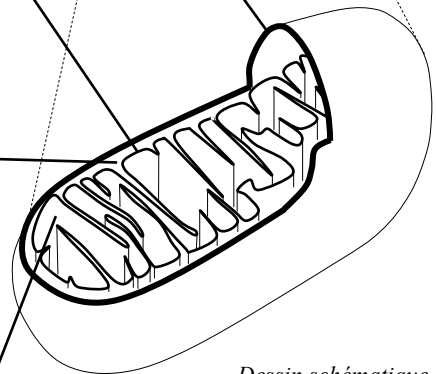
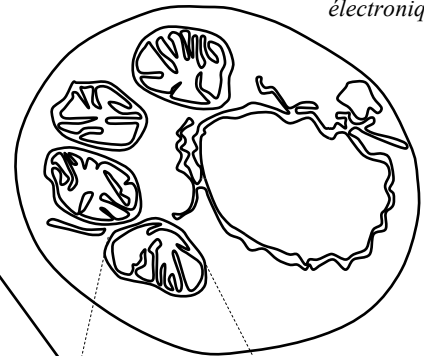
**La membrane interne** très sélective, délimite l'espace matriciel de la mitochondrie qui présente une morphologie particulière en forme de crêtes. Elle contient un éventail de protéines membranaires spécialisées capables d'assurer des fonctions biologiques très diversifiées. L'une de ces fonctions est la régénération de l'ADP à partir de l'ATP. Cette membrane est également impliquée dans l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP matriciel néosynthétisé.

**L'espace intermembranaire** ou chambre mitochondriale externe, contient plusieurs enzymes comme des protéines impliquées dans la machinerie d'import, ou des enzymes de la chaîne respiratoire comme le cytochrome *c*. Ce compartiment joue un rôle essentiel dans le processus de synthèse d'ATP, en accumulant des protons qui créent localement le gradient protonique.

**La matrice** ou chambre mitochondriale interne, important espace interne contenant un mélange très concentré d'enzymes, dont celles nécessaires à l'oxydation des pyruvates et des acides gras ( $\beta$  oxydation ou hélice de Lynen) et au cycle de l'acide citrique (cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs). La matrice contient aussi diverses copies identiques du génome de l'ADN mitochondrial, des ribosomes mitochondriaux spécifiques, des ARNt et diverses enzymes nécessaires à l'expression des gènes mitochondriaux.

**Figure I.3 : Organisation générale d'une mitochondrie.** Dans le foie, on estime que 67% des protéines totales de la mitochondrie sont localisées dans la matrice, 21% dans la membrane interne, 6% dans la membrane externe et 6% dans l'espace intermembranaire. Comme indiqué ci-dessous, chacune de ces quatre régions contient un groupe particulier de protéines qui ont des fonctions spécifiques.

*Schéma d'une levure *S. cerevisiae* observé en microscopie électronique*



*Dessin schématique d'une mitochondrie*

Les mitochondries sont entourées par deux membranes (externe et interne) qui délimitent deux sous compartiments mitochondriaux : l'espace intermembranaire et la matrice. Un troisième système membranaire, les crêtes mitochondriales, délimité par la membrane interne est localisé à l'intérieur de la matrice (Zick *et al.*, 2009). Il a été montré que les membranes interne et externe sont très proches l'une de l'autre dans des conditions de fixation préservant l'ultrastructure mitochondriale (Frey et Mannella, 2000). Certaines conditions de fixation et/ou métabolique induisent un élargissement de cet espace intermembranaire et dévoilent à l'inverse l'existence de sites de contact qui restent cependant peu caractérisés (Brdiczka, 1991; Reichert et Neupert, 2002). La présence de ces derniers a été postulée pour la première fois en 1968 suite à l'observation par microscopie électronique de mitochondries chimiquement et physiquement fixées (Hackenbrock, 1968). Il a été suggéré qu'ils puissent jouer un rôle dans le passage de métabolites entre le cytoplasme cellulaire et la matrice mitochondriale. Aujourd'hui, les sites de contact sont décrits comme des zones très stables qui représentent entre 5 et 10% de la surface de la membrane externe. Les deux membranes sont si rapprochées (environ 4 nm) qu'elles ne peuvent pas être séparées par les forces mécaniques habituellement utilisées pour le fractionnement des mitochondries, notamment un traitement aux ultrasons (Fraser et Zammit, 1998). Ces sites de contacts mitochondriaux sont très probablement multiples. Cependant, certains d'entre eux, loin d'être si résistants, sont formés de façon transitoire par l'association de protéines membranaires telles que les protéines Tom22 et Tim21 retrouvées respectivement dans les membranes externe et interne de la mitochondrie (Reichert et Neupert, 2002; Albrecht *et al.*, 2006). Ces associations permettraient l'import de protéines du cytoplasme vers la membrane interne de la mitochondrie (Albrecht *et al.*, 2006). D'autres sites de contact sont supposés être impliqués dans des phénomènes cellulaires variés, très différents de l'import de protéines, tels que la biogénèse des hormones stéroïdiennes (Papadopoulos et Brown, 1995) ou le transfert de phospholipides entre les mitochondries et certaines membranes du réticulum endoplasmique (Ardail *et al.*, 1993). Enfin, il a été proposé que certains sites de contact soient induits par l'interaction de la porine VDAC (« *Voltage Dependent Anion Channel* », localisée dans la membrane externe) avec le transporteur d'ADP/ATP (nommé par la suite Ancp, localisé dans la membrane interne) et la MtCK (« *Mitochondrial Creatin Kinase* », soluble dans l'espace intermembranaire) (Hoppel *et al.*, 2002; Speer *et al.*, 2005). Ce modèle reste cependant spéculatif et fait l'objet de controverses. Le complexe ainsi formé serait impliqué dans des mécanismes moléculaires liés au métabolisme énergétique et à l'apoptose cellulaire (Brdiczka *et al.*, 2006).

### I.2.2 Organisation moléculaire et supramoléculaire des mitochondries

En microscopie optique, les mitochondries apparaissent sous forme de granules, de bâtonnets ou de filaments de longueurs variables, d'où leur appellation, introduite en 1898, bâtie avec les mots grecs *mitos* (filament) et *chondros* (granule). Ces structures sont mobiles et changent leur morphologie en formant fréquemment un réseau de mitochondries interconnectées (Ernster et Schatz, 1981; Tzagoloff, 1982; Bereiter-Hahn, 1990). Ces caractéristiques ont conduit à penser que l'ensemble des mitochondries pouvait former un compartiment unique, appelé « chondriome ». Cette organisation tridimensionnelle (3D) n'était pas apparente dans les coupes fines (50-100µm) couramment utilisées en microscopie électronique à transmission. Dans ces dernières, les mitochondries apparaissent sous forme d'entités circulaires ou cylindriques dont la taille et la morphologie rappellent celles de leurs précurseurs phylogénétiques, les bactéries. L'idée d'un compartiment mitochondrial unique a donc été abandonnée au profit de l'existence d'un grand nombre de mitochondries indépendantes les unes des autres. En outre, l'organisation des mitochondries en réseau n'apparaissait pas nécessaire à leur fonctionnement. En effet, l'isolement par fractionnement cellulaire produit systématiquement des mitochondries fragmentées qui ne présentent aucun déficit dans leur activité respiratoire ou autre (Ernster et Schatz, 1981). La notion de mitochondries indépendantes est restée dominante pendant de nombreuses années, malgré de nombreux travaux montrant que les mitochondries adoptent une morphologie filamenteuse ressemblant plus à un réseau de membranes interconnectées qu'à une collection d'entités séparées (Ernster et Schatz, 1981; Tzagoloff, 1982; Bereiter-Hahn, 1990).

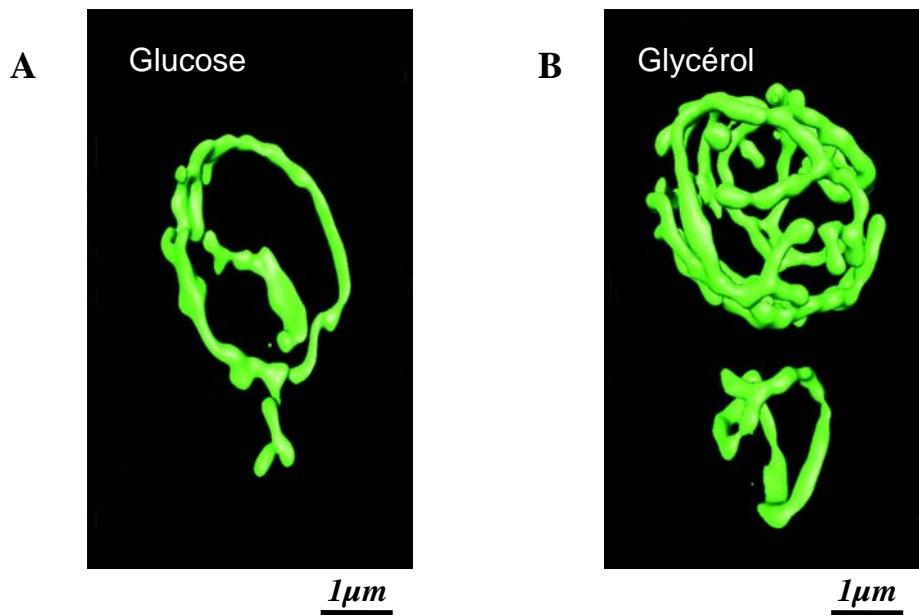
### I.2.3 Dynamique du compartiment mitochondrial

Dès les années 60, des observations faites chez *S. cerevisiae* ont révélé l'existence d'un cycle dynamique des mitochondries. Les cytosquelettes d'actine, de tubuline et de filaments intermédiaires jouent des rôles clefs dans l'organisation cellulaire en général, et dans la localisation et la dynamique des mitochondries en particulier. Leur contribution dans la structuration du compartiment mitochondrial n'est pas encore complètement élucidée. Chez la levure *S. cerevisiae*, la dynamique mitochondriale est mue principalement par des interactions avec le cytosquelette d'actine (Boldogh *et al.*, 2001). Par contre, chez *Schizosaccharomyces pombe*, elle dépend essentiellement d'une association avec les microtubules (Yaffe *et al.*, 1996). La situation est plus complexe chez les vertébrés et d'autres organismes pluricellulaires. Les mitochondries de cellules de mammifères sont en effet localisées au niveau des microtubules

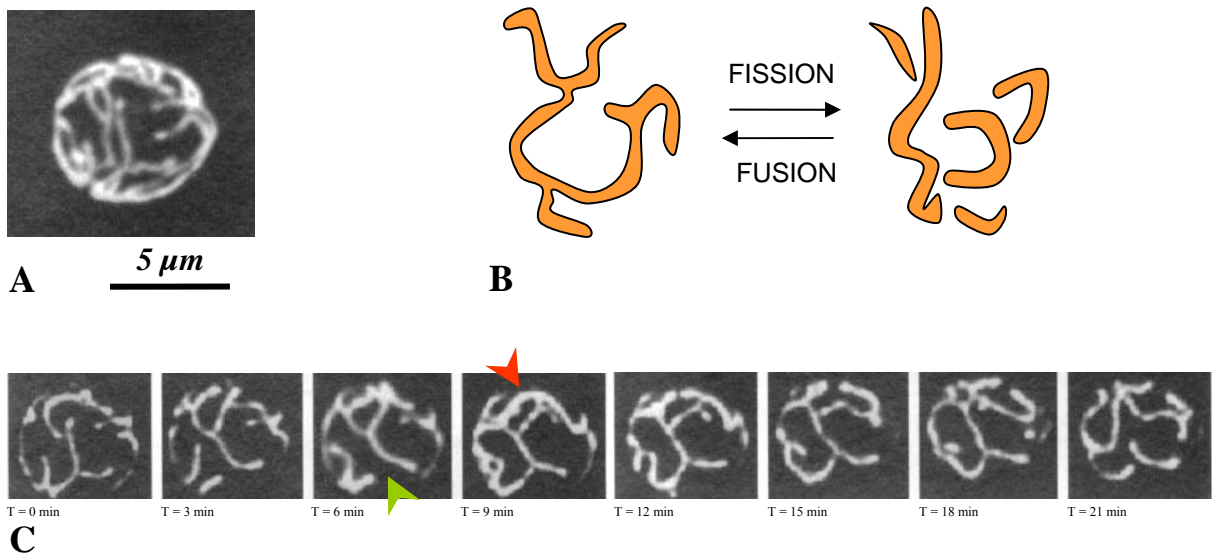
(Heggeness *et al.*, 1978) et leur mouvement dépend de moteurs moléculaires associés à ces structures (Nangaku *et al.*, 1994). Cependant, le mouvement des mitochondries dans les axones neuronaux réquisitionne en plus le cytosquelette d'actine (Morris et Hollenbeck, 1995). Les filaments intermédiaires ont été également impliqués (Summerhayes *et al.*, 1983) mais leur rôle biologique reste discuté (Sarria *et al.*, 1994). On peut aujourd'hui observer directement cette dynamique des mitochondries en marquant les protéines mitochondriales par des étiquettes fluorescentes dérivées de la GFP (« *Green Fluorescent Protein* »). Il apparaît alors clairement que les mitochondries forment un réseau continu dont la forme est fréquemment remaniée à cause de phénomènes de fusions ou de fissions entre des compartiments distincts (**Figure I.4A**). Lorsque la levure tire son énergie de la respiration, ce réseau mitochondrial prend une extension notable et le processus s'accompagne d'un développement prononcé de la membrane interne (**Figure I.4B**). Toutefois, chez la levure, les mitochondries restent présentes même dans des conditions où la fermentation est le seul mode de production d'ATP.

#### I.2.4 Fusion et fission mitochondriales

L'observation des mitochondries dans des cellules vivantes révèle la nature très dynamique du compartiment mitochondrial et montre des événements apparents de fusion et de fission (**Figure I.5**). Néanmoins, la résolution du microscope optique ne permet pas d'établir si ces événements correspondent à des appositions entre mitochondries, à des fusions n'impliquant que la membrane mitochondriale externe ou à des fusions complètes des membranes externe et interne. La fusion complète des membranes mitochondriales a été démontrée pour la première fois par Nunnari et ses collaborateurs (1997) chez *S. cerevisiae* (Nunnari *et al.*, 1997). L'identification et la caractérisation des acteurs protéiques impliqués dans la dynamique mitochondriale progressent régulièrement, surtout chez *S. cerevisiae* (Okamoto et Shaw, 2005; Coonrod *et al.*, 2007; Meglei et McQuibban, 2009). Certains travaux révèlent également dans les phénomènes de fusion l'importance de la composition lipidique de la membrane mitochondriale (Detmer et Chan, 2007).



**Figure I.4 : Les mitochondries de *S. cerevisiae*.** (Egner *et al.*, 2002). Marquage à l'aide d'une fusion GFP du compartiment mitochondrial de *S. cerevisiae* (A) dont la source de carbone est de type fermentescible. (B) On observe qu'une croissance des levures sur une source de carbone non fermentescible comme le glycérol donne un réseau mitochondrial large et ramifié en comparaison d'une source de carbone fermentescible comme le glucose.

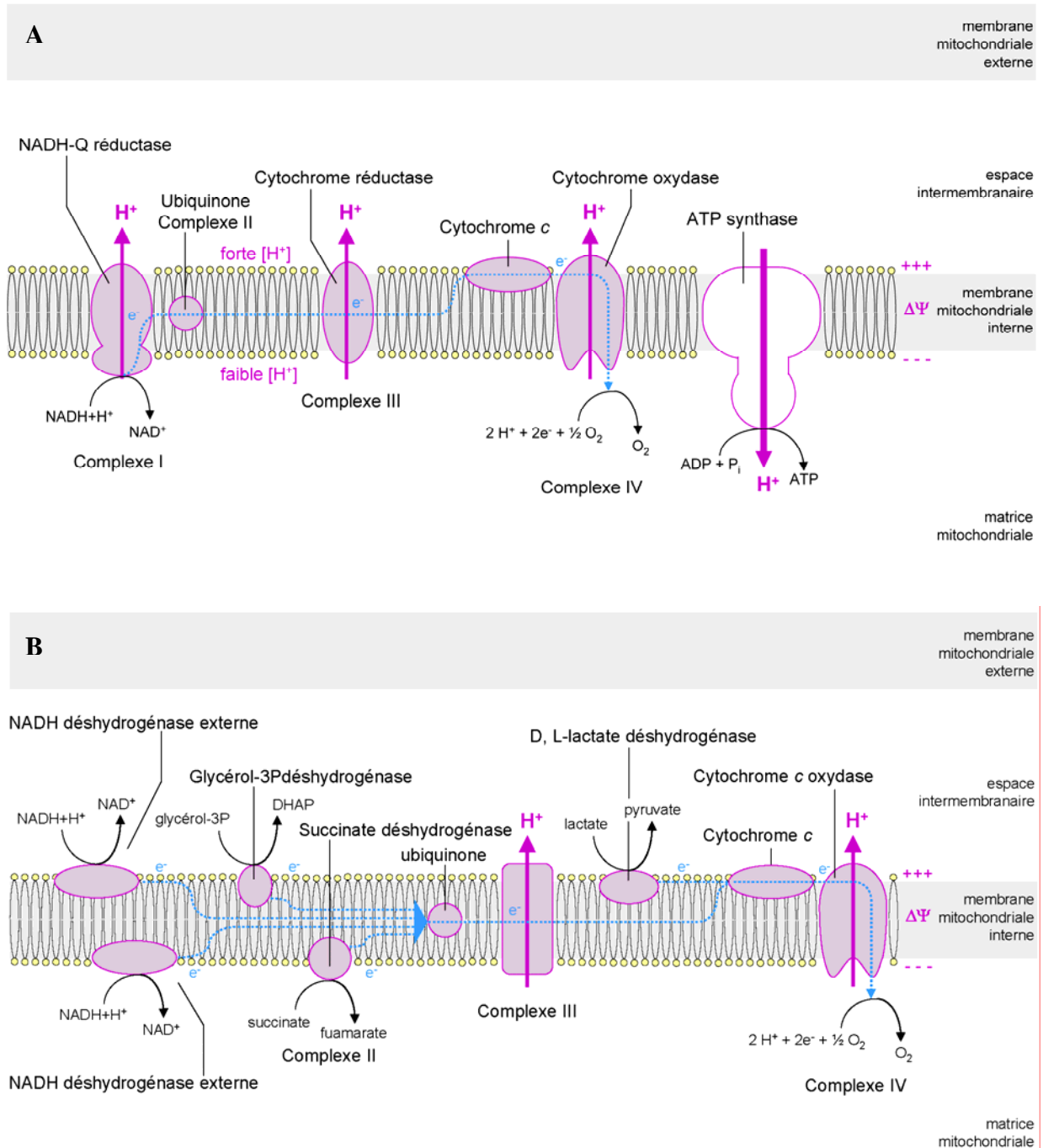


**Figure I.5 : Réticulum mitochondrial dynamique.** (A) Dans les cellules de levures, les mitochondries forment un réticulum continu placé sous la membrane plasmique. (B) L'équilibre entre la fission et la fusion de ce réticulum détermine l'arrangement des mitochondries dans les différentes cellules. (C) Observation en microscopie à fluorescence montrant en fonction du temps, le comportement dynamique du réseau mitochondrial dans une cellule de levure. En plus de ses variations de forme, le réseau est constamment remodelé par des phénomènes de fission (flèche rouge) et fusion (flèche verte). Les photographies ont été prises à des intervalles de temps T de 3 minutes (A et C, d'après (Nunnari *et al.*, 1997)).

### I.2.5 Rôle primordial dans la biosynthèse d'ATP

Les mitochondries jouent un rôle déterminant au niveau cellulaire. En effet, elles sont impliquées dans l'apoptose, la thermogénèse, l'homéostasie du calcium, et dans de nombreuses voies anaboliques comme la synthèse de l'hème, des protéines en centre fer-soufre, des nucléotides ou encore des stéroïdes. Mais, elle joue avant tout un rôle fondamental dans le catabolisme oxydatif aboutissant à la production d'une forme utilisable d'énergie, l'ATP. L'énergie cellulaire provenant de l'oxydation des glucides, des acides gras et des acides aminés est libérée dans la matrice mitochondriale sous forme d'équivalents réducteurs ( $\text{NADH}/\text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$ ). Ces équivalents sont de nouveau oxydés au niveau de la membrane interne mitochondriale par plusieurs complexes protéiques, formant la chaîne respiratoire (**Figure I.6**). Les protéines formant les complexes de la chaîne respiratoire sont codées à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Les électrons cédés aux complexes seront ensuite acheminés vers l'accepteur final, l'oxygène. Ces transferts d'électrons sont couplés, au niveau des complexes I, II et IV, à un transport de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (**Figure I.6A**). La membrane interne des mitochondries, imperméable aux protons, empêche leur retour vers la matrice d'où un potentiel de charge de part et d'autre de cette membrane ( $\Delta\Psi$ ). Le retour des protons dans la matrice mitochondriale *via* le complexe V (ATP synthase) est couplé à une synthèse d'ATP par condensation d'ADP et de  $\text{P}_i$ .

Dans la levure, il n'existe pas de complexe I, mais trois NADH déshydrogénases localisées dans la membrane interne (Luttik *et al.*, 1998) (**Figure I.6B**). L'une, dite « interne », est exposée vers la matrice mitochondriale et permet l'oxydation du NADH produit par l'alcool déshydrogénase et le cycle de Krebs. Les deuxièmes, dites « externes », sont exposées vers l'espace intermembranaire. Elles donnent leurs électrons, provenant de la déshydrogénation du lactate, directement au cytochrome *c*. L'activité de ces NADH déshydrogénases n'est pas couplée à un transport de protons. La chaîne respiratoire de levure ne possède donc que deux sites de translocation des protons, au niveau des complexes III et IV, au lieu de trois (**Figure I.6B**). Enfin, l'ATP matriciel néosynthétisé suite à l'effondrement du gradient de protons, doit être délivré au niveau du cytosol afin de fournir en énergie la cellule. A l'inverse, l'ADP cytosolique ainsi que le  $\text{P}_i$  doivent être acheminés dans la mitochondrie. Ces échanges font appel à une machinerie de transport mettant en jeu la porine VDAC localisée dans la membrane externe mitochondriale et deux protéines de la membrane interne : l'Ancp et le transporteur de phosphate noté PiC pour « *Phosphate inorganic Carrier* ».



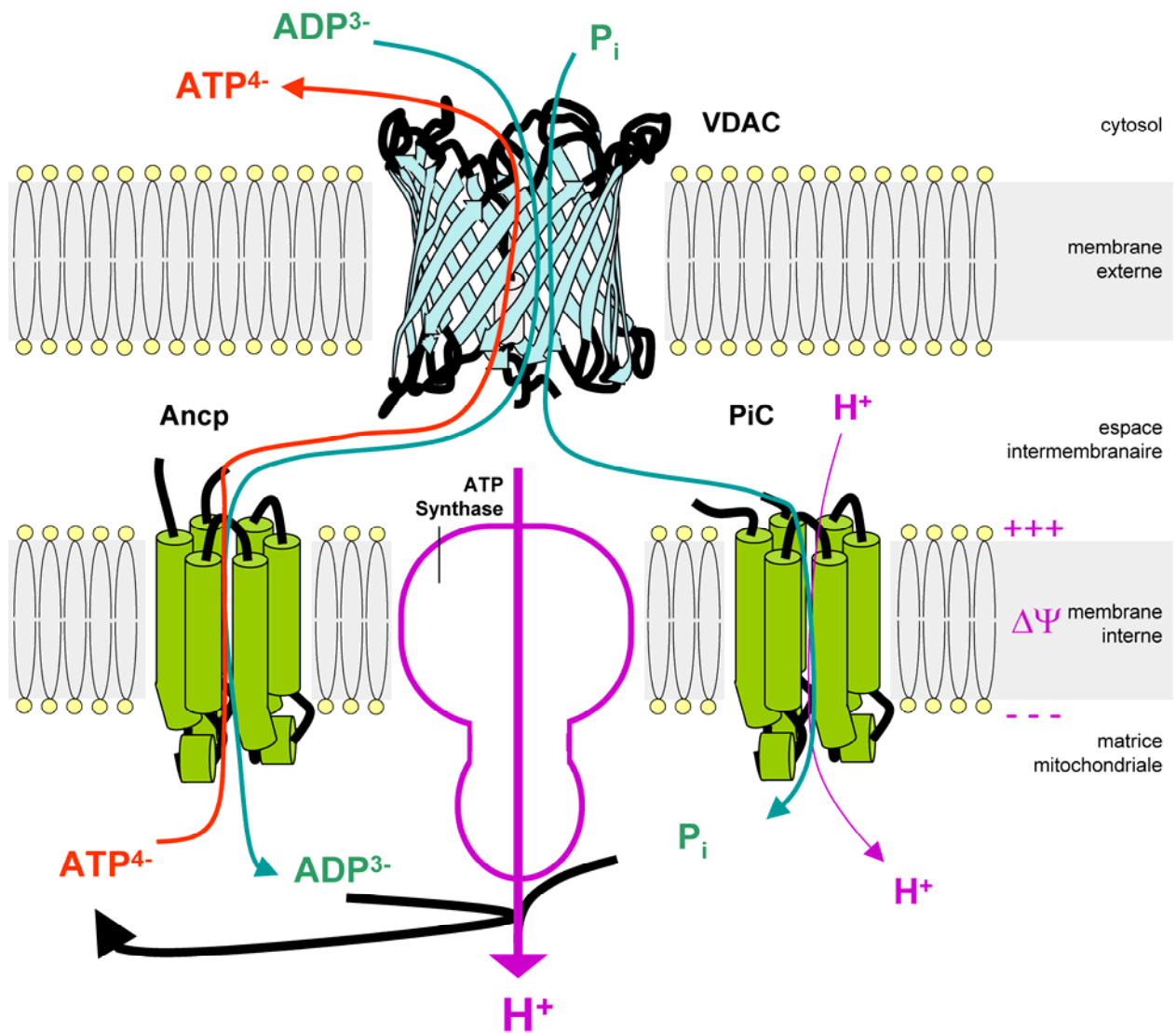
**Figure I.6 : Les transferts d'électrons dans la membrane interne des mitochondries. (A)** Chez la plupart des eucaryotes, le transfert d'électrons passe par la NADH-ubiquinone réductase transmembranaire (absente chez *S. cerevisiae* et chez *S. pombe*), l'ubiquinone (le seul intermédiaire non-protéique), l'ubiquinol-cytochrome C réductase (transmembranaire), le cytochrome *c* et la cytochrome *c* oxydase (transmembranaire). Celle-ci est le dernier transporteur de la chaîne et transfère les électrons à l'accepteur final : l'O₂ dissout dans la matrice. Des molécules d'eau se forment ainsi, par la réaction :  $\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ . Les flèches de couleur rose indiquent le transfert des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et leur retour vers la matrice, couplé à synthèse d'ATP via la pompe à proton (ATP synthase). **(B)** Chaîne mitochondriale de transport d'électrons chez *S. cerevisiae*. Comme chez *S. pombe*, le transport membranaire d'électrons se fait sans le complexe I (Rosenfeld et Beauvoit, 2003).

### I.3 La machinerie mitochondriale du transport d'ADP, d'ATP et du Pi

La synthèse d'ATP n'est pas le seul processus actionné par le gradient électrochimique de protons. En effet, dans les mitochondries, beaucoup de petites molécules chargées, comme l'ADP et le Pi, sont transportées dans la matrice à partir du cytosol tandis que d'autres, comme l'ATP, doivent être déplacées dans la direction opposée (**Figure I.7**). Les protéines membranaires qui assurent le transport de ces molécules peuvent coupler leur passage de la membrane interne au flux énergétiquement favorable de protons dans la matrice mitochondriale. Par exemple, le Pi est co-transporté avec un proton par le PiC de l'espace intermembranaire jusque dans la matrice (Stappen et Kramer, 1994). A l'opposé, l'ADP est co-transporté avec l'ATP dans des directions opposées par l'Ancp (Duce et Vignais, 1965; Pfaff *et al.*, 1965). Comme la molécule d'ATP possède une charge négative supplémentaire par rapport à l'ADP, chaque échange de nucléotide s'accompagne du déplacement d'une charge négative de l'intérieur vers l'extérieur de la matrice mitochondriale. Ce co-transport ADP/ATP est ainsi facilité par la différence de potentiel que l'on retrouve de part et d'autre de la membrane interne. Enfin, il a été proposé que le passage des nucléotides adényliques et *a fortiori* du Pi à travers la membrane externe mitochondriale soit principalement assuré par la porine VDAC (Rostovtseva et Bezrukov, 2008).

Les propriétés biochimiques des principaux acteurs de cette machinerie, c'est-à-dire l'Ancp, le PiC et la porine VDAC, dont l'étude respective a été abordée à différents niveaux dans ce projet de thèse, sont décrites dans les parties qui suivent. Les données de la littérature qui sont exposées ci-après concernent principalement les travaux réalisés directement chez la levure ou à partir d'expression hétérologue de protéines de levure. De plus, il est également important de noter que le modèle proposé dans la **Figure I.7** ne concerne que la levure où la MtCK est absente ([www.yeastgenome.org/](http://www.yeastgenome.org/)). En effet, il existe chez les organismes supérieurs, en particulier dans les cellules myocardiques, la MtCK qui catalyse la transphosphorylation de la créatine (Cr) en phosphocréatine (PCr) à partir de l'hydrolyse de l'ATP mitochondrial néosynthétisé dans la matrice (Jacobus et Lehninger, 1973; Bessman et Carpenter, 1985). Cette enzyme forme un octamère qui se localise dans l'espace intermembranaire et au niveau des crêtes mitochondriales (Wallimann *et al.*, 1992; Schlattner *et al.*, 1998). Comme l'Ancp, il a été montré que la MtCK interagit avec des cardiolipides spécifiquement retrouvés dans la membrane interne (Schlattner *et al.*, 1998; Schlattner *et al.*, 2009). D'autres travaux suggèrent que la MtCK interagit avec les phospholipides de la membrane externe ainsi qu'avec la porine VDAC (Schlattner *et al.*, 2001). Un modèle dans lequel la MtCK est associée au VDAC et à l'Ancp a été proposé afin d'assurer



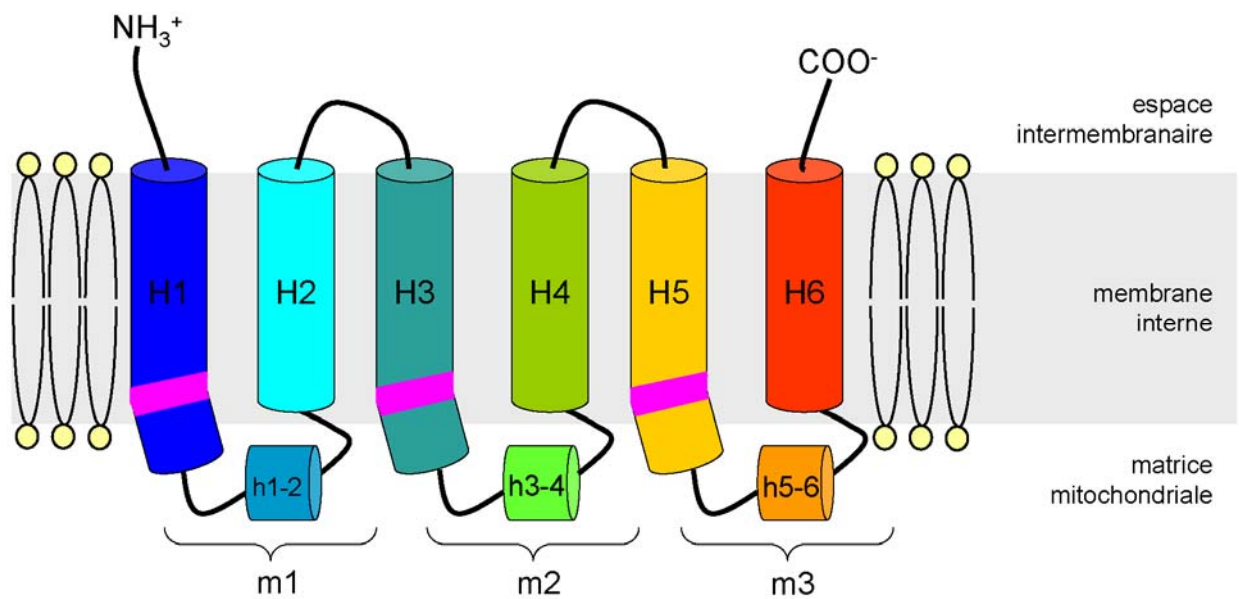


**Figure I.7 : Modèle de machinerie de transport actif actionné par le gradient électrochimique de protons à travers la double membrane mitochondriale.** Les phosphates inorganiques (P_i) et l'ADP sont importés dans la matrice via deux transporteurs l'Ancp et le PiC ; Tandis que l'ATP synthétisé au niveau de l'ATP synthétase est pompé à l'extérieur. La charge de chaque molécule transportée est indiquée. Le potentiel de membrane est négatif dans la matrice. La membrane externe assure librement le passage de ces composés à l'aide de la porine VDAC.

le « *channelling* » de l'ATP à travers les membranes mitochondriales et contribuer par la même occasion à la formation des sites de contacts mitochondriaux (Schlattner *et al.*, 2004). Ce modèle reste cependant très spéculatif.

### I.3.1 Les transporteurs mitochondriaux

La membrane interne constitue une véritable barrière garant du maintien du potentiel de membrane. Les protéines de la membrane interne seraient au nombre de 200 environ. On distingue principalement les transporteurs d'électrons (complexes de la chaîne respiratoire), l'ATP synthase et les transporteurs mitochondriaux. L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale impose la présence de transporteurs membranaires appartenant à des familles différentes, la plus prolifique étant celle des transporteurs mitochondriaux (nommé MCF pour « *Mitochondrial Carrier Family* »). Les membres de cette famille (une trentaine chez l'homme) réalisent l'import et l'export des métabolites nécessaires au bon fonctionnement de la mitochondrie et au maintien de la vie cellulaire. Ces molécules sont pour la plupart des anions de petites tailles (<500 Da) comme l'ADP et l'ATP, des acides carboxyliques (oxaloacétate, malate, citrate, *etc.*) ou encore des molécules inorganiques (Pi). Il a également été démontré que certains de ces transporteurs étaient capables de transporter des cations. C'est le cas de l'UCP (« *UnCoupling Protein* ») qui réalise le transport d'un proton (Klingenberg *et al.*, 2001) et des MRS (« *Mitochondrial RNA-Splicing protein* ») qui transportent du fer sous la forme d'ions ferreux (Froschauer *et al.*, 2009). Les transporteurs appartenant à la MCF sont caractérisés par la présence, au niveau de la séquence protéique, d'une signature peptidique qui est la suivante : PX(D/E)XXK/R puis 20 à 30 résidus en amont de cette séquence : (D/E)GXXXX(W/Y)F(K/R)G, où X représente un acide aminé quelconque (Walker et Runswick, 1993; Haitina *et al.*, 2006). Tous ces transporteurs présentent en plus d'autres caractéristiques communes dont certaines sont tirées des données obtenues sur les Ancp qui sont les plus étudiés : i), ils sont codés par le génome nucléaire ; ii), leur structure primaire est issue de la double duplication d'un gène ancestral (codant 3 fois 100 acides aminés environ) et leur masse molaire est donc comprise entre 30 et 35 kDa (Walker et Runswick, 1993) ; iii), chaque tiers de la protéine est composé de deux hélices transmembranaires reliées entre elles par une grande boucle contenant une petite hélice matricielle. Les hélices impaires sont coudées au niveau de la proline retrouvée dans la signature de la MCF (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003) (**Figure I.8**) ; enfin, iv), leur point isoélectrique est élevé (>8).



**Figure I.8 : Modèle d'un membre de la MCF déduit de la structure 3D du complexe transporteur bovin (bAnc1p).** Les extrémités *N*- et *C*-terminales sont situées dans l'espace intermembranaire. H1 à H6 : hélices transmembranaires. h1-2, h3-4 et h5-6 : hélices matricielles. m1, m2 et m3 : boucles matricielles. La zone en rose représente la signature des membres de la MCF.

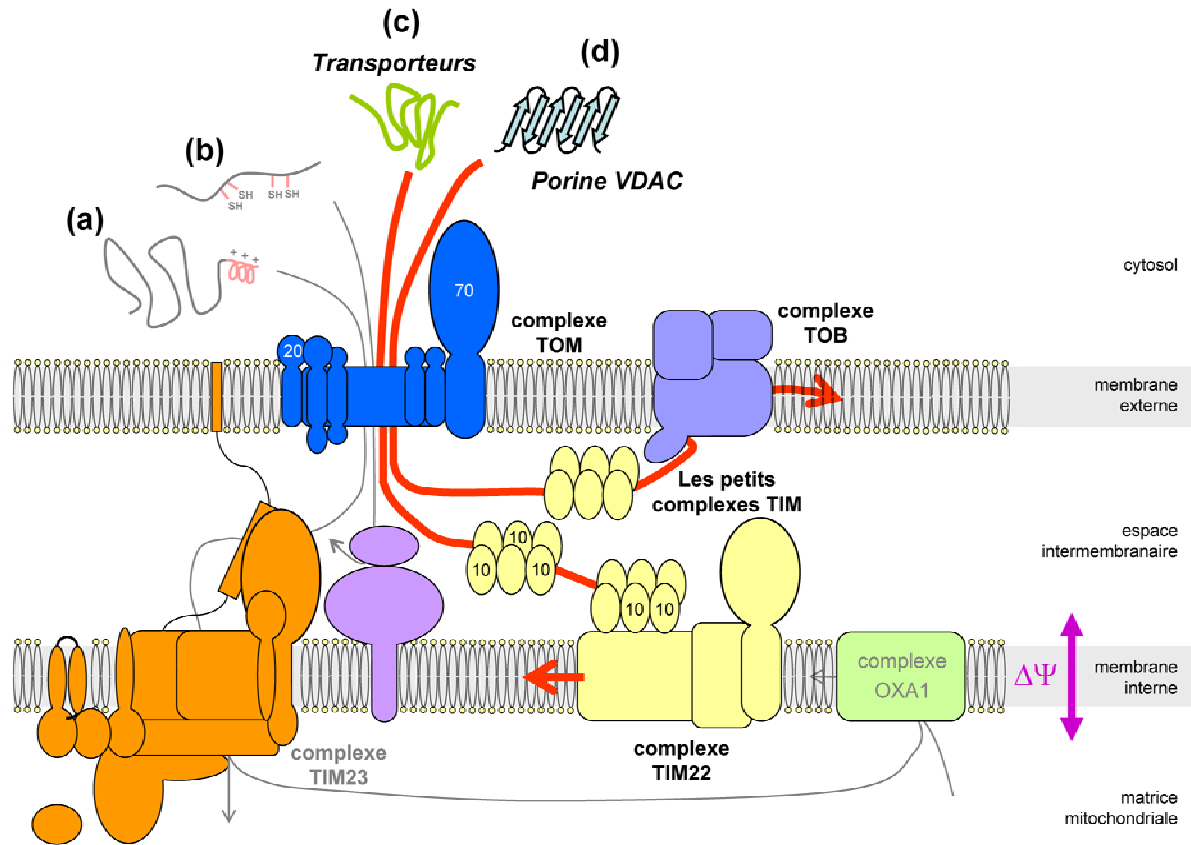
A la différence de la plupart des protéines mitochondriales, les membres de la MCF ne présentent pas de peptides signaux amino terminaux à quelques exceptions près (Zara *et al.*, 1992; Zara *et al.*, 2003; Zara *et al.*, 2005; Mokranjac et Neupert, 2009). Du fait de la nature extrêmement hydrophobe des transporteurs mitochondriaux, il est difficile d'identifier d'autres signaux peptidiques linéaires potentiels d'import mitochondrial. Cependant, il a été montré que plusieurs régions du transporteur PiC sont capables de se lier à la machinerie d'import mitochondrial dont la complexité est illustrée dans la **Figure I.9** (Brix *et al.*, 1999). Alors que Tom70 semble interagir avec des domaines hydrophobes du transporteur PiC (Brix *et al.*, 1999), Tom20, un autre récepteur d'import de protéine de la membrane externe, semble plutôt reconnaître des régions hydrophiles de ce même transporteur (Brix *et al.*, 1999). Des études ont montrés que les segments transmembranaires correspondant aux hélices H3, H4 et H5 de l'isoforme 2 du transporteur d'ADP/ATP de levure (noté par la suite ScAnc2p) se lient fortement à des régions du complexe chaperonne Tim10 (Curran *et al.*, 2002; Vasiljev *et al.*, 2004; Vergnolle *et al.*, 2005). Ce résultat suggère que les interactions hydrophobes jouent un rôle important dans l'import des transporteurs de l'espace intermembranaire vers la membrane interne. D'autres travaux proposent que la région C-terminale de ScAnc2p soit importante dans la liaison à Tom70 et Tom20 (Wiedemann *et al.*, 2001).

### **I.3.1.1 Le transporteur de phosphate PiC**

Le transporteur de phosphate mitochondrial (nommé dans la littérature PiC pour « *Phosphate inorganic Carrier* » ou PTP pour « *Phosphate Transport Protein* ») catalyse le transport du Pi à l'intérieur de la matrice mitochondriale où ce dernier est utilisé principalement pour la phosphorylation oxydative (Wohlrab, 1980; Wohlrab, 1986; Kramer et Palmieri, 1989; Wehrle et Pedersen, 1989) et notamment dans la biosynthèse d'ATP. Tout comme les Ancp, ce transporteur est indispensable au développement cellulaire des organismes aérobie strict.

#### **I.3.1.1.1 Découverte et propriétés biochimiques du PiC**

La découverte du transporteur PiC bovin ainsi que du gène associé (*PIC*) remonte à presque 20 ans (Aquila *et al.*, 1987; Walker et Runswick, 1993). Le gène *PIC* a par la suite été séquencé et cloné chez la levure *S. cerevisiae* (Phelps *et al.*, 1991). Ce transporteur qui fait parti de la MCF avec six segments transmembranaires (Aquila *et al.*, 1985; Kuan et Saier, 1993), au même titre que l'Ancp, reste néanmoins peu caractérisé.



**Figure I.9 : Modèle simplifié de la machinerie d'import des protéines mitochondriales de *S. cerevisiae* en particulier la porine VDAC et les transporteurs mitochondriaux.** Le transport est de type transmembranaire, par opposition au transport par SAS (« *Something About Silencing* ») des protéines nucléaires. La forte conservation des protéines impliquées indique que ce mécanisme n'est guère différent dans les mitochondries humaines. Le passage des protéines dans la mitochondrie dépend d'un signal d'adressage. Une partie des polypeptides mitochondriaux est synthétisée sous la forme de pré-protéines avec un motif d'adressage amino terminal (a), formé d'une hélice  $\alpha$  amphiphile (chargée positivement d'un côté et hydrophobe de l'autre) allant de 20 à 60 acides aminés. Reconnu, ce motif est par la suite clivé par une protéase de maturation. Cependant, le domaine d'adressage peut également être interne au polypeptide, soit par la présence de groupement thiol (b), signal qui oriente les protéines dans l'espace intermembranaire ou soit par des caractéristiques structurales globales (c). C'est notamment le cas dans la plupart des protéines destinées à la membrane interne. Dans le cytoplasme, les futures protéines mitochondriales sont dépliées par des chaperones du type « *Heat Shock Protein* » qui les présentent selon leurs signaux d'adressage à trois translocases multiprotéiques mitochondriales (TOM, TIM22 et TIM23). Ces translocases les orientent vers les mitochondries. Dans le complexe TOM seul Tom 20 et Tom 70 sont indiqués par un chiffre écrit en blanc. Un quatrième complexe, OXA1 (« *mitochondrial inner membrane insertase* »), assure l'import et l'assemblage des protéines de la membrane interne synthétisées dans la matrice. Le complexe TOM (« *Translocase of the Outer Membrane* ») localisé dans la membrane externe présente deux récepteurs sur le versant cytoplasmique, un pour les pré-protéines à signal N-terminal et un autre (Tom70) pour les protéines à signal interne (cas des membres de la MCF). Les porines mitochondriales sont quant à elles reconnues par le complexe TOM puis sont prises en charges par les petits complexes TIM où seul Tim 10 est identifié par un chiffre écrit en noir (« *Translocase of the Inner Membrane* ») pour les amener finalement au complexe TOB (« *outer-membrane  $\beta$ -barrel proteins* ») qui permet leurs insertions dans la membrane externe mitochondriale (pour revue : (Mokranjac et Neupert, 2009)).

### I.3.1.1.2 Mécanisme de transport du PiC mitochondrial

Le transporteur PiC catalyse le passage à travers la membrane interne d'un phosphate électroneutre de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. Le mécanisme mis en jeu est très mal connu. Un mode de transport passif utilisant le gradient de protons a été proposé. Le PiC fonctionnerait alors comme un symport  $\text{Pi}/\text{H}^+$  (Stappen et Kramer, 1993; Phelps *et al.*, 1996) ou de manière alternative comme un antiport  $\text{Pi}/\text{OH}^-$  (Stappen et Kramer, 1993; Stappen et Kramer, 1994). Il a également été suggéré que le Pi puisse être transporté spécifiquement et uniquement sous forme monochargée (Herick *et al.*, 1995). Cependant, des composés tels que l'arsenic (qui se substitue au phosphore) ou le monofluorophosphate dichargé sont également transportés (Freitag et Kadenbach, 1978). Le méthyl-phosphonate est également transporté alors que le butyl et le décyl-phosphonate ne le sont pas, de même que le phosphonoformate et le phosphonopyruvate (**Figure I.10**) (Engstova *et al.*, 2001). Par contre, le méthylène diphosphonate et le méthylène monophosphonate sont des inhibiteurs du PiC (Engstova *et al.*, 2001). Concernant le mécanisme du transport, certaines expériences montrent que le PiC de *S. cerevisiae* peut basculer pour un mode de fonctionnement uniport après avoir été modifié en présence de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) au niveau de la cystéine 28 (Schroers *et al.*, 1997). Enfin, le PiC est inhibé par des acides gras, en particulier par l'acide 12-(4-azido-2-nitrophenylamino) dodecanoïque (AzDA) (Zackova *et al.*, 2000). Il est d'ailleurs photomarké par des dérivés d'acides gras portant un groupement azido-nitrophenyl (Engstova *et al.*, 2001). Suite à l'ensemble de ces résultats, il a été proposé que ce transporteur puisse être également impliqué dans le métabolisme des acides gras (Zackova *et al.*, 2000).

Des études biochimiques du transporteur PiC de levure ont été réalisées après expression exogène sous forme de corps d'inclusions chez *Escherichia coli* (Wohlrab et Briggs, 1994). Les études fonctionnelles du transporteur PiC de levure ont montré que le N-éthylmaléimide (NEM), un réactif des groupements thiols, était capable de cibler spécifiquement la cystéine 28 de ce transporteur à raison d'un NEM par sous-unité de PiC en inhibant le transport de Pi (Wohlrab et Briggs, 1994). Une étude de mutants cystéine du transporteur PiC de levure exprimés à partir de corps d'inclusions a par la suite été réalisée (Schroers *et al.*, 1997). Les cystéines en position 28, 134 et 300 ont été remplacées une par une par des sérines. Les résultats ont montré dans un premier temps que la cystéine 300, proche de l'extrémité C-terminale, ainsi que la cystéine 134, localisée dans le troisième segment transmembranaire, sont accessibles au réactif hydrophile butyle-SH, contrairement à la cystéine 28 localisée dans le premier segment transmembranaire. Cette fixation du réactif à la cystéine 134 entraîne une inhibition complète du transport. La

capacité de conversion réversible du transporteur PiC d'un mode de transport uniport en antiport (**voir § I.3.1.1.2**) semble être dépendante uniquement de la cystéine 28 (Schroers *et al.*, 1997). Le PiC de *S. cerevisiae* exprimé en corps d'inclusion dans *E. coli* peut être partiellement resolubilisé en présence de Sarkosyl (détergent ionique appelé également sodium lauroyl sarcosinate) et donne des protéines monomériques ou non structurées. Après échange du détergent par un polyoxyéthylène (C₁₂E₈) et dialyse, le PiC s'associe alors en dimères stables et fonctionnels (Schroers *et al.*, 1998). Bien qu'il soit admis que l'Ancp ait des caractéristiques communes au PiC, il n'y a actuellement aucune évidence biochimique d'une structure monomérique du PiC contrairement à l'Ancp (Klingenberg, 2008).

### **I.3.1.2 Le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial**

#### **I.3.1.2.1 Généralités**

Un des membres de la MCF, le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial, met à la disposition des besoins cellulaires, l'ATP néosynthétisé dans la matrice mitochondriale en le libérant dans l'espace intermembranaire en échange d'ADP. C'est en 1965 qu'E. Pfaff met en évidence un échange spécifique des nucléotides adényliques au travers des membranes de mitochondries isolées de foie de rat (Pfaff *et al.*, 1965) et démontre l'existence d'un transporteur spécifique. Peu après, deux équipes démontrent que ce transporteur est de nature protéique (Duce et Vignais, 1965; Pfaff *et al.*, 1965). Le nom de transporteur d'ADP/ATP mitochondrial est alors proposé (Klingenberg et Pfaff, 1968). Pour rappel, l'abréviation qui sera utilisée pour nommer ce transporteur est Ancp.

Cette protéine joue un rôle extrêmement important au niveau physiologique de par la place centrale qu'elle occupe dans le renouvellement de l'énergie cellulaire. En effet, un homme renouvelle en un jour son propre poids d'ATP et, pour une large partie, cet ATP transite par l'Ancp. En 1997, la construction d'une lignée de souris transgéniques déficientes pour le gène *mANCI* codant pour la principale isoforme musculaire de l'Ancp a conduit à des animaux viables mais présentant une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des fibres musculaires squelettiques (Graham *et al.*, 1997). Chez l'homme, toute défaillance de cette protéine (notée HAnc1p) est à l'origine de myopathies telles que des ophtalmoplégies (Bakker *et al.*, 1993; Kaukonen *et al.*, 2000; Fiore *et al.*, 2001; Napoli *et al.*, 2001; Trezeguet *et al.*, 2008). Il existe 6 mutations ponctuelles pathologiques dans l'HAnc1p, une causant une cardiomyopathie et 5 causant des ophtalmoplégies externes progressives (adPEO) : une forme sporadique (V289M) et

4 formes familiales (A90D, A114P, L98P, D104G) (Kaukonen *et al.*, 2000; Napoli *et al.*, 2001; Komaki *et al.*, 2002; Siciliano *et al.*, 2003; Deschauer *et al.*, 2005). Toutes ces mutations sont situées du côté de l'espace intermembranaire dans la structure 3D de l'isoforme 1 de l'Ancp bovin (bAnc1p) complexé au carboxyatractyloside (bAnc1p-CATR) et 3 d'entre-elles (A90D, L98P et A114P) sont localisées à l'interface lipide-protéine (Trezeguet *et al.*, 2008).

### **I.3.1.2.2 Les caractéristiques biochimiques du transport d'ADP/ATP**

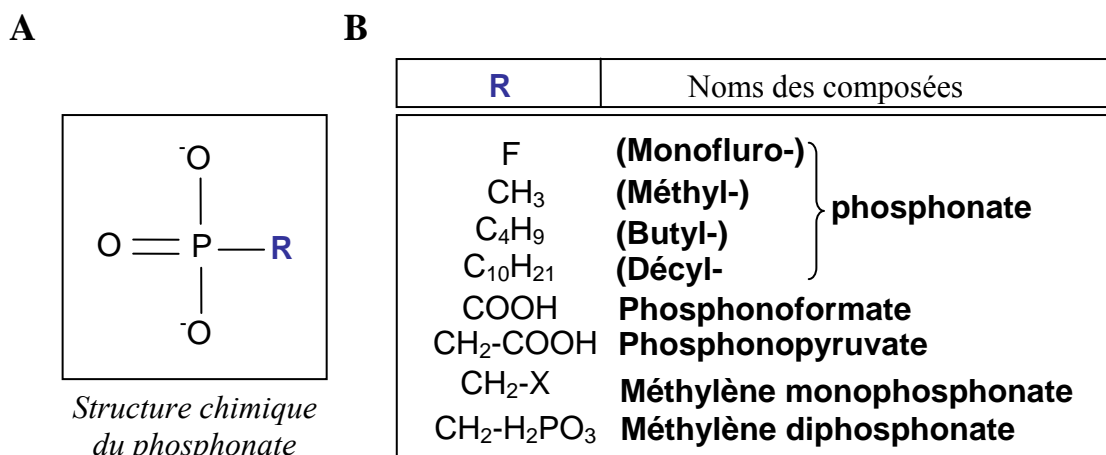
#### **I.3.1.2.2.1 Le transport de nucléotides**

L'Ancp mitochondrial réalise l'échange d'une grande quantité des nucléotides adényliques, mais présente une activité de transport peu élevée de l'ordre de 1000 à 2000 min⁻¹ à 20°C pour des mitochondries isolées de cœur de rat (Vignais, 1976; Klingenberg, 1980). Cette faible vitesse de transport est palliée physiologiquement par une grande abondance de la protéine dans les membranes mitochondriales. En effet, l'Ancp peut représenter dans certains tissus près de 10% des protéines de la membrane interne mitochondriale. Dans des conditions physiologiques, une molécule d'ADP cytosolique est échangée contre une molécule d'ATP matricielle, toutes deux sous la forme de nucléotides libres chargés respectivement 3⁻ et 4⁻ (Duee et Vignais, 1965; Pfaff *et al.*, 1965). Cet échange est donc électrogénique et sa direction est imposée par le potentiel électrochimique de membrane créé par la chaîne respiratoire (LaNoue *et al.*, 1978; Duszynski *et al.*, 1981). En l'absence de ce potentiel, le transporteur d'ADP/ATP peut indifféremment échanger de l'ADP ou de l'ATP contre l'un ou l'autre des nucléotides transportés (Kramer et Klingenberg, 1980).

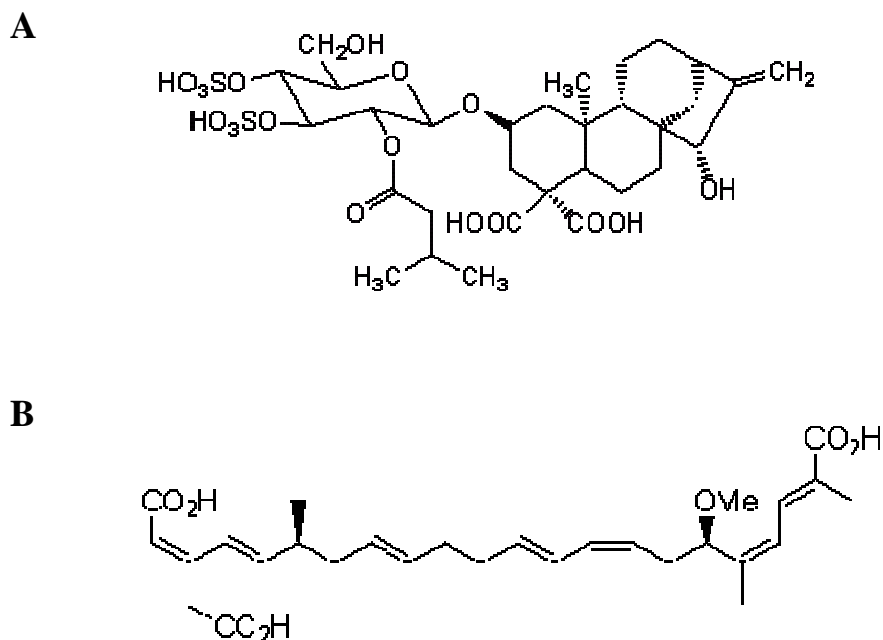
#### **I.3.1.2.2.2 Les inhibiteurs du transport d'ADP/ATP**

Des molécules d'origine naturelle ont été mises en évidence après avoir causé des empoisonnements aigus autant chez l'homme que chez les animaux. Ces molécules, se sont révélées être des inhibiteurs de l'échange des nucléotides adényliques, qui bloquent l'Ancp de façon spécifique. Ces dernières appartiennent principalement à deux familles, les atractylosides et les acides bongkréiques (**Figure I.11**). Ces molécules, présentant des structures chimiques





**Figure I.10 : Structure chimique des principales molécules interagissant avec le transporteur de Pi.** (A) Structure chimique du phosphonate où R peut correspondre à plusieurs composés chimique. (B) Liste des différents composés qui dérivent du phosphonate selon la nature du R.



**Figure I.11 : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP.** (A) Le carboxyatractylide, membre de la famille des atractylosides. (B) L'acide bongkreique (BA).

différentes, sont capables de figer le transporteur dans des conformations stables présentant des propriétés biochimiques particulières (Klingenberg, 2008).

#### I.3.1.2.2.1 Les atractylosides

Les atractylosides sont des poisons naturels extrêmement toxiques, produits par des plantes telles que le chardon à glu *Atractylis gummifera* (une plante du bassin méditerranéen) au niveau de leurs rhizomes. Ces molécules présentent toutes un résidu de glucose disulfaté sur les carbones 3 et 4 ainsi qu'une chaîne isovalérique sur le carbone 2 et un acide kaurenoïque légèrement modifié (l'atractyligénine) lié au carbone 1 par une liaison éther. En 1878, Lefranc isole le premier membre de cette famille d'inhibiteurs : l'atractyloside (noté ATR). Plus tard, une molécule très proche de l'ATR est isolée et nommée premièrement gummiférine, puis carboxyatractyloside (noté CATR) (**Figure I.11A**) une fois sa structure chimique identifiée et comparée à celle de l'ATR (Stanislas et Vignais, 1964; Vignais *et al.*, 1973). Chez les animaux, l'ATR est un inhibiteur compétitif du transporteur des nucléotides adényliques, alors que le CATR inhibe l'Ancp de manière non compétitive. Les constantes de dissociation ( $K_d$ ) des complexes transporteurs bovin-inhibiteur (bAnc1p-ATR et bAnc1p-CATR) sont respectivement d'environ 200 nM et 20 nM. D'autres plantes produisent des molécules voisines de l'ATR comme *Wedelia asperima* qui produit le wedeloside dont l'affinité pour le transporteur est comparable à celle du CATR (Aquila *et al.*, 1985), ou encore *Xanthium pungens* qui produit des dérivés de CATR désulfatés (MacLeod *et al.*, 1990; Stewart et Steenkamp, 2000). De nombreux dérivés de l'ATR ou du CATR ont été synthétisés, dans lesquels l'alcool primaire porté par le carbone 6 du résidu glucose (**Figure I.11A**) a été modifié par voie chimique afin, par exemple, d'y incorporer un groupement acétyle radioactif (Block *et al.*, 1981).

#### I.3.1.2.2.2 Les acides bongkréiques

La deuxième famille d'inhibiteurs est représentée par les acides bongkréique (BA) et iso-bongkréique (iso-BA). Dans des conditions d'hygrométrie et de température spécifiques, ces molécules naturelles sont sécrétées par une bactérie, *Bukholderia cocovenenans*, qui se développe sur la pulpe de noix de coco (Henderson et Lardy, 1970; Lauquin *et al.*, 1976b). Leur structure chimique, différente de celle des ATRs, contient une longue chaîne carbonée polyinsaturée et trois groupements acides carboxyliques répartis de part et d'autre de la molécule

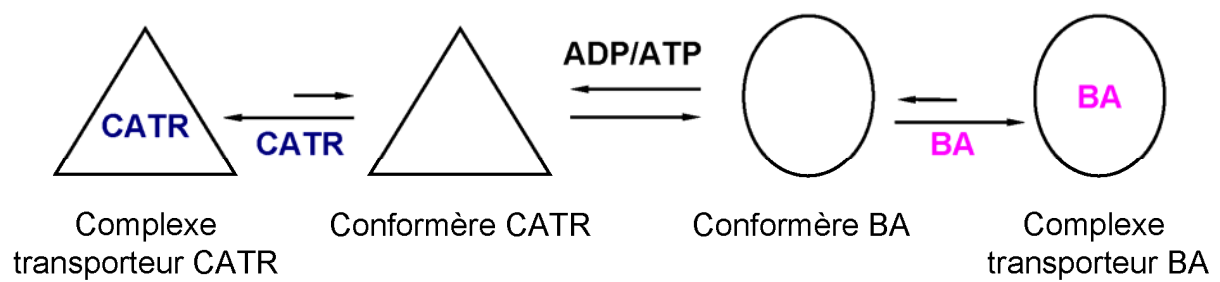
(**Figure I.11B**). Néanmoins, leur affinité pour le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial est également très forte et, comme pour le CATR, caractérisée par des  $K_d$  voisins de 20 nM.

#### I.3.1.2.2.3 Les autres inhibiteurs

D'autres molécules sont capables d'interagir avec le transporteur mais de manière beaucoup moins spécifique. On peut citer par exemple les dérivés d'acides gras comme les Acyl-CoA, des agents pontants comme le complexe cuivre-ortho-phénanthroline (Majima *et al.*, 2002) ou des dérivés fluorescents de nucléotides adényliques, photoactivable tel que le 2-azido-3'-O-naphtoyl-ADP (Dianoux *et al.*, 2000), ou non photoactivable comme le naphtoyl-ADP (Mayer *et al.*, 1984; Block *et al.*, 1986). Ces dérivés ont permis l'étude biochimique des Ancp en apportant notamment des informations sur les conformations adoptées par le transporteur au cours du mécanisme de transport des nucléotides à travers la membrane interne mitochondriale (Klingenberg, 2008).

#### I.3.1.2.2.3 Aspects conformationnels du transporteur d'ADP/ATP

Au cours de l'échange des nucléotides, l'Ancp oscille entre plusieurs conformations mises en évidence à l'aide de différentes approches (Brandolin *et al.*, 1993). Une étude par fluorescence intrinsèque des tryptophanes menée sur le transporteur bovin isolé en micelles de détergent a mis en évidence des états conformationnels, respectivement de basse et haute fluorescence, en présence de CATR et de BA dont le passage de l'un à l'autre nécessite la présence d'ATP (**Figure I.12**) (Dupont *et al.*, 1982). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'Ancp de levure (Le Saux *et al.*, 1996). L'hypothèse selon laquelle le transporteur oscillerait au sein de la membrane entre ces différentes conformations lors du transport des nucléotides a été confirmée par l'utilisation d'un dérivé fluorescent non transporté de l'ADP, le 2-azido-3'-O-naphtoyl-ADP N-ADP (Block *et al.*, 1981). Sa fixation sur l'Ancp natif bovin dans la membrane et l'analyse de son déplacement par le CATR et le BA a permis de visualiser une augmentation de fluorescence liée à la libération de la sonde fixée, qui n'est totale qu'en présence d'une faible concentration de nucléotides transportables. Une autre étude de l'Ancp bovin a mis en évidence que certains détergents, comme le LAPAO et le CHAPS étaient capables de favoriser respectivement la conformation capable de fixer le CATR, appelée conformère CATR et celle capable de fixer le BA, appelée conformère BA (**Figure I.12**) (Block *et al.*, 1981).



**Figure I.12 : Etats conformationnels adoptés par l'Ancp.** Le transporteur d'ADP/ATP oscille entre différentes conformations dont deux, les conformères CATR et BA (représentés respectivement par un triangle et un cercle), peuvent être bloqués de façon spécifique par le CATR et le BA. Le changement conformationnel d'un conformère à l'autre est accéléré par l'ADP et l'ATP.

#### I.3.1.2.2.4 Etat oligomérique du transporteur d'ADP/ATP

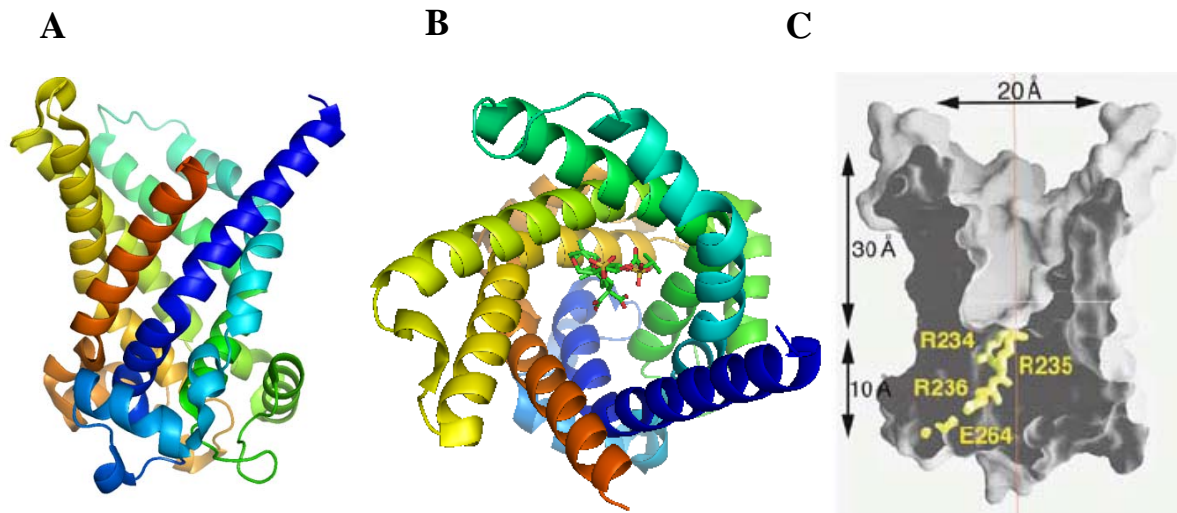
C'est en 1975 que les premières données sur la possible multimérisation de l'Ancp ont été publiées (Riccio *et al.*, 1975). Une analyse de la stœchiométrie Ancp/CATR a montré qu'une mole d'inhibiteur se fixait sur deux moles d'Ancp, suggérant la présence d'une structure dimérique (Riccio *et al.*, 1975). Ces résultats ont été confirmés par d'autres analyses physico-chimiques et biophysiques. En effet, des données similaires ont été obtenues avec le complexe transporteur-BA et des expériences de centrifugation analytique et de diffusion de neutrons aux petits angles ont également montré la présence d'une forme dimérique de la protéine dans les micelles de détergents (Aquila *et al.*, 1978; Hackenberg et Klingenberg, 1980; Block *et al.*, 1982). De plus, des preuves expérimentales d'une structure dimérique pour d'autres membres de la MCF comme le transporteur d'oxaloglutarate, de citrate, ou de Pi, soutiennent une nouvelle fois un mécanisme d'oligomérisation des transporteurs mitochondriaux (Bisaccia *et al.*, 1996; Schroers *et al.*, 1998; Kotaria *et al.*, 1999). L'hypothèse d'une unité fonctionnelle tétramérique peut également être émise car deux sites de fixation des nucléotides d'affinités différentes ont pu être caractérisés par unité de transport et sur chaque face du transporteur (Brandolin *et al.*, 1982; Block et Vignais, 1984).

Cependant des résultats récents remettent en cause l'état oligomérique des membres de la MCF. La structure à haute résolution obtenue à partir de cristaux du complexe bAnc1p-CATR met en évidence un monomère unique sur lequel est fixée une molécule de CATR (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Dans une autre structure du même complexe, ce monomère unique apparaît en contact avec un autre monomère (Nury *et al.*, 2005). Cependant, ce dimère cristallographique semble artéfactuel et va à l'encontre des données précédemment publiées puisqu'il contient une molécule de CATR par monomère et non par dimère. De plus, les récentes expériences de centrifugation analytique s'appuyant sur des améliorations des systèmes d'analyse et de traitement des données, remettent en cause les résultats publiés au début des années 80 et tendent à montrer que l'Ancp bovin complexé au CATR serait majoritairement monomérique en solution dans du Triton X100, mais présenterait aussi minoritairement des formes multimériques (Nury *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont également été obtenus sur les Ancp de levure *via* des approches biochimiques ou biophysiques (Bamber *et al.*, 2006; Bamber *et al.*, 2007a; Bamber *et al.*, 2007b).

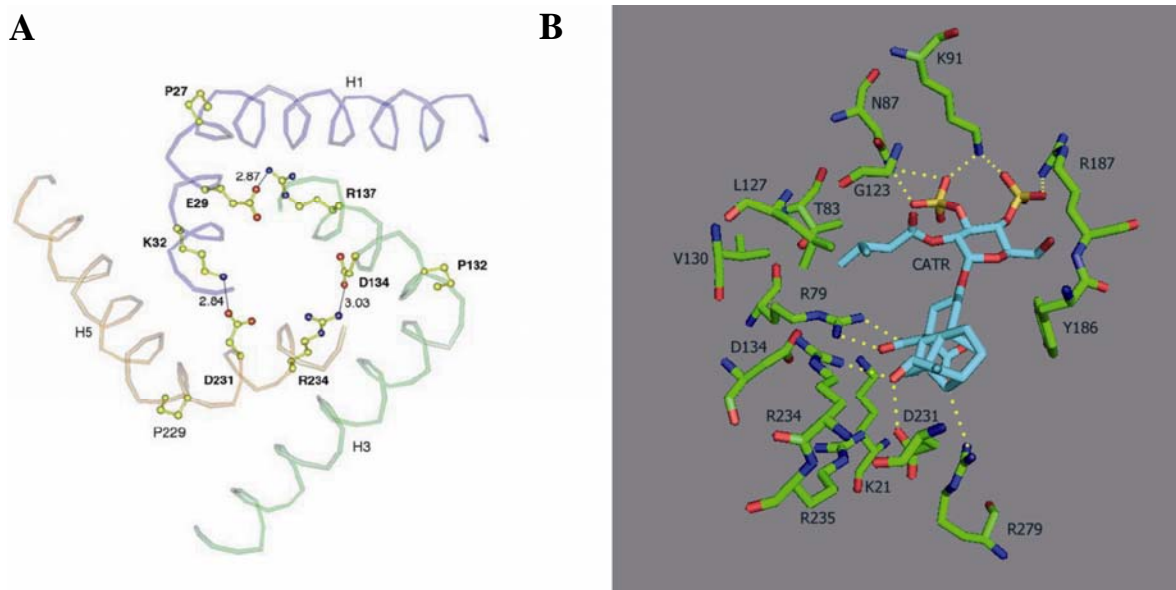
### I.3.1.2.3 Aspects structuraux du transporteur d'ADP/ATP

Seule la structure à haute résolution du complexe transporteur bAnc1p-CATR a été obtenue par diffraction des rayons X. La protéine s'organise en hélices  $\alpha$  et présente une pseudo symétrie d'ordre 3 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Chaque tiers comporte deux hélices transmembranaires fortement inclinées par rapport au plan perpendiculaire à la membrane ainsi qu'une hélice courte, située du côté matriciel, orientée parallèlement à la membrane (**Figure I.13A et 13B**). Les six hélices membranaires forment une cavité représentant un entonnoir de 20 Å de large et de 30 Å de profondeur dans laquelle est fixé son inhibiteur le CATR (**Figure I.13C**). Celle-ci est ouverte vers l'espace intermembranaire et fermée du côté matriciel par une barrière polypeptidique de 10 Å d'épaisseur. La couronne externe de la cavité, située du côté de l'espace intermembranaire, forme un hexagone et le fond, du côté matriciel, est fermé par le resserrement des trois hélices transmembranaires impaires toutes coudées au niveau d'une proline, résidu qui appartient à la signature des transporteurs de la MCF (**Figure I.14A**). Le contact entre les côtés C-terminaux des hélices transmembranaires impaires qui ferment la cavité est stabilisé par la présence de trois ponts salins établis entre les chaînes latérales des résidus K32(H1)-D134(H3) ; R137(H3)-D231(H5) ; R234(H5)-E29(H1) que l'on retrouve dans les signatures des membres de la MCF (**Figure I.14A**).

Dans la structure du complexe bAnc1p-CATR, le CATR est fixé au fond de la cavité et du côté de l'hélice H4, ce qui va à l'encontre des propositions localisant le CATR à l'interface entre 2 monomères émis d'après les études par photomarquage (Majima *et al.*, 1993). Il est orienté verticalement, la partie glucosidique vers l'espace intermembranaire et le noyau diterpénique vers le fond de la cavité (en direction de la matrice). Sa fixation est stabilisée par des interactions de tous les groupements fonctionnels de la molécule avec la chaîne peptidique, à l'exception de l'alcool primaire porté par le dérivé de glucose (**Figure I.14B**). Cette non-implication de la fonction alcool et son faible encombrement stérique explique pourquoi celle-ci est la seule position modifiable par voie chimique qui n'altère pas les propriétés inhibitrices de l'ATR (Vignais, 1976). Cependant, cela n'explique pas pourquoi cette position est difficilement modifiable dans la molécule de CATR. Les autres fonctions portées par le dérivé de glucose, c'est-à-dire les sulfates et la chaîne isovalérique, participent grandement à l'affinité de la molécule pour le transporteur. Plus précisément, les sulfates portés par les carbones 3 et 4 du glucose interagissent en formant des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales de l'asparagine 87 et de la lysine 91 de l'hélice H2 et de l'arginine 187 de l'hélice H4 (**Figure I.14B**).



**Figure I.13 : Structure 3D du complexe bAncp-CATR.** (A) Diagramme en ruban présentant la protéine vue à travers la membrane ou (B) de l'espace intermembranaire complexée avec son inhibiteur. La structure de la protéine est colorée du bleu (N-terminal) au rouge (C-terminal). (C) Vue en coupe de la structure du complexe bAnc1p-CATR présentant la séquence RRR contenue uniquement dans la signature des transporteurs d'ADP/ATP mitochondriaux (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).



**Figure I.14 : Détails structuraux du complexe bAnc1p-CATR.** (A) Positionnement des ponts salins dans le complexe bAnc1p-CATR. Les résidus présentés en gras appartiennent à la signature des membres de la MCF, PX(D/E)XXK/R. Les hélices impaires (H1, H3 et H5) sont les seules représentées sur cette vue (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). (B) Interaction entre le CATR et bAnc1p. Seules les liaisons H directes (en jaune) et les acides aminés présentant des interactions avec le CATR sont indiqués. Le squelette carboné du CATR est représenté en bleu, celui des acides aminés en vert. Les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre sont schématisés respectivement en rouge, bleu et jaune.

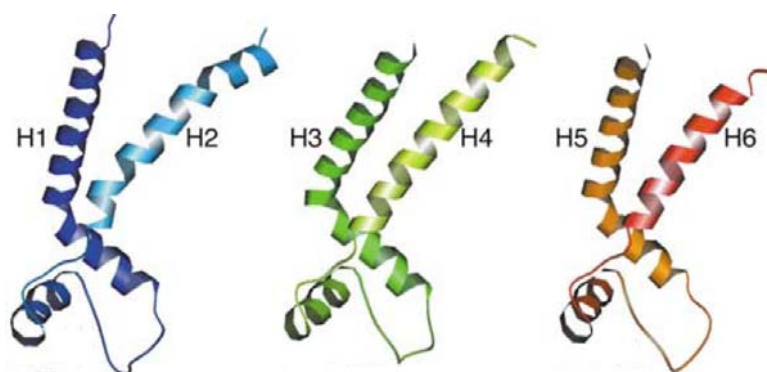
La chaîne isovalérique en position 2 forme quant à elle des liaisons de type Van der Waals avec différents acides aminés du transporteur, comme la thréonine 83 (H2), la glycine 123 (H3), la leucine 127 (H3) et la valine 130 (H3), ainsi que l'isoleucine 183 (H4) (**Figure I.14B**). L'autre partie de l'inhibiteur, c'est à dire le noyau diterpénique, est presque parallèle au noyau phénolique de la tyrosine 186 (H4) et interagit par sa fonction hydroxyle avec les résidus aspartate 231 et arginine 234 de l'hélice 5 (**Figure I.14B**). Les deux groupements carboxyliques portés par le même carbone (C₄) du noyau diterpénique sont en interaction directe, ou médiée par une molécule d'eau, avec des lysines ou des arginines. En effet, le groupement carboxylique présent dans le CATR et l'ATR, interagit avec l'arginine 279 portée par l'hélice 6 (**Figure I.14B**). L'autre groupement carboxylique, spécifique au CATR, interagit fortement avec l'arginine 79 de l'hélice H2 et forme des liaisons hydrogènes par l'intermédiaire de molécules d'eau avec la lysine 21 de l'hélice 1, l'aspartate 134 de l'hélice 3, et les arginines 234 et 235 de l'hélice 5 (**Figure I.14B**). Ces interactions supplémentaires du CATR avec la protéine pourraient expliquer que son affinité pour le transporteur soit 10 fois supérieure à celle de l'ATR.

#### I.3.1.2.4 Les transporteurs d'ADP/ATP de levure (ScAnc2p)

L'étude du transporteur d'ADP/ATP a été menée depuis de nombreuses années sur la levure *S. cerevisiae* en s'appuyant sur les possibilités de génie génétique (Lauquin *et al.*, 1976a). La levure *S. cerevisiae* possède 3 isoformes de l'Ancp nommées ScAnc1p, ScAnc2p, et ScAnc3p qui présentent des caractéristiques physiologiques différentes. L'isoforme 1 est codée par le gène *ScANCI* porté par le chromosome XIII de la levure. Il est exprimé faiblement et de manière constitutive en condition aérobie. Il est par contre réprimé en absence d'oxygène (Gavurnikova *et al.*, 1996). La deuxième isoforme est codée par le gène *ScANC2* porté par le chromosome II. Il est fortement exprimé en condition aérobie et en présence d'une source de carbone non fermentescible comme le lactate (Lawson et Douglas, 1988). Il est nécessaire à la croissance des levures sur un milieu non fermentescible et représente donc l'homologue de bAnc1p avec qui il partage approximativement 50% d'identité de séquence (Drgon *et al.*, 1991) (**Figure I.15**). De par sa forte expression et son lien avec la production d'énergie lors de la respiration, l'isoforme 2 de l'Ancp de *S. cerevisiae* est la plus étudiée. Enfin, la troisième isoforme est codée par le gène *ScANC3* dont l'expression est réprimée en présence d'oxygène (Kolarov *et al.*, 1990; Sabova *et al.*, 1993). Les trois gènes codent respectivement des transporteurs de 309, 318 et 307 acides aminés. Actuellement, aucune donnée structurale du transporteur d'ADP/ATP de *S. cerevisiae*



bAnc1p	1	-----SDQALSFLKDFLAGGVAAAI SKTAVAPIERVKLLL	
		: :          : : :             :	
ScAnc2p	1	SSNAQVKTPLPAPAPKKESNFLIDFLMGGVSAAVAKTAASPIERVKLLI	
bAnc1p	36	QVQ-HASKQISAEKQYKGIIDCVVRIPKEQGFLSFWRGNLANVIRYFPTQ	
		: : :    :    : :             :	
ScAnc2p	51	QNQDEMLKQGTLD RKYAGILDCFKRTATQEGVISFWRGNTANVIRYFPTQ	
bAnc1p	85	ALNFAFKDKYKQIFLGGVDRHKQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLD	
		:    : : : :	
ScAnc2p	101	ALNFAFKDKIKAMF--GFKKEEGYAKWFAGNLASGGAAGALSLLFVYSLD	
bAnc1p	135	FARTRLAAD---VGKGAAQREFTGLGNCITKIFKSDGLRGLYQGFNVSVQ	
		:              :       :      :    :	
ScAnc2p	149	YARTRLAADSKSSKKGGA-RQFNGLIDVYKKTLSKSDGVAGLYRGFLPSVV	
bAnc1p	182	GIIYRAAYFGVYDTAKG-MLPDPKNVHIIVSWMIAQTVTAVAGLVSYPF	
		:       : :    :  :   : :	
ScAnc2p	198	GIVVYRGLYFGMYDSLKPLLLTGSLEGSFLASFLLGWVVTTGASTCSYPL	
bAnc1p	231	DTVRRRMMMQSGRKGADIMYTGTVDCWRKIAKDEGPKAFFKGAWSNVLRG	
		: :            :     : :	
ScAnc2p	248	DTVRRRMMMTSGQA---VKYDGAFDCLRKIVAAEGVGSFLFKGCGANILRG	
bAnc1p	281	MGGAFVLVLYDEI-----KKFV	297
		:      : : :	
ScAnc2p	295	VAGAGVISMYDQLQMILFGKKFK	317



**Figure I.15 : Alignement des séquences primaires des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p.** L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme *Needle*. Les barres repèrent les acides aminés identiques ; les deux points les résidus homologues. La numérotation fait référence à la séquence du transporteur ScAnc2p. Les deux séquences présentent 49,5% d'identité. Chaque tiers répétés de bAnc1p est indiqués directement sur sa séquence primaire en acides aminées en bleu, vert et orange au code couleur employé dans la représentation des structures secondaire de ces régions (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003).

n'a été obtenue et même si des éléments semblent indiquer des différences notables entre bAnc1p et ScAnc2p (pour revue : (Trezeguet *et al.*, 2008)), l'organisation spatiale de ce dernier est représentée à l'image de celle du complexe bAnc1p-CATR (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). En combinant la possibilité de réaliser facilement des mutants chez la levure *S. cerevisiae* grâce à l'outil de génie génétique et la faculté des levures à croître en utilisant la fermentation ou la respiration, il a été possible d'étudier au niveau moléculaire, le mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane interne mitochondriale, principalement *via* ScAnc2p.

#### I.3.1.2.4.1 Les mutants de ScAnc2p

L'étude des Ancp humains dans des organismes permettant de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée, comme la levure *S. cerevisiae*, est rendue difficile à cause d'un problème d'expression dans la cellule et/ou d'import de ces protéines dans la mitochondrie (De Marcos Lousa *et al.*, 2002). Les principales expériences de mutagenèse dirigée rapportées concernent donc la protéine ScAnc2p. Dans ce système, il est simple d'évaluer la conséquence d'une mutation ponctuelle sur la fonction de l'Ancp par la mesure des paramètres cinétiques de croissance des souches mutantes sur des substrats non fermentescibles. Cependant, il est difficile d'attribuer l'effet délétère de la mutation à un repliement incorrect de la chaîne polypeptidique ou à un défaut de reconnaissance et/ou de transport des nucléotides. Le **Tableau I.1** résume les principaux résultats des expériences de mutagenèse dirigée rapportés dans la littérature. Les correspondances entre les numéros des résidus des protéines bAnc1p et ScAnc2p sont indiquées sur la base de l'alignement des séquences primaires des deux protéines (**Figure I.15**).

Parmi l'ensemble des résultats obtenus, si l'on se réfère à la structure bAnc1p-CATR, il est intéressant de noter que la mutation de résidus impliqués dans la fixation du CATR ou dans les ponts salins fermant la cavité du côté matriciel aboutit à une perte ou à une diminution de la viabilité des levures sur un milieu non fermentescible. Ces résidus joueraient donc un rôle important dans la fonction de transport. Il s'agit chez la levure des résidus basiques K37, R95, R203, R251, R252 et R293 et des résidus acides D148 et D248 (**Tableau I.1**). Ces observations tendent à prouver que les sites de fixation des substrats et du CATR ont des résidus communs même s'il est impossible de définir le site de fixation des nucléotides avec précisions sur la base de la structure du complexe bAnc1p-CATR. Les seules positions, dont la mutation entraîne la non fonctionnalité du transporteur et qui ne sont pas impliqués dans la fixation du CATR correspondent chez la levure aux résidus basiques K47, R151 et R253 (**Tableau I.1**).

Mutation dans ScAnc2p	Position dans ScAnc2p (*)	Correspondance dans bAnc1p	Références bibliographiques	Viabilité	Expression de ScAnc2p %WT	Sites ATR %WT	Vitesse d'échange ADP/ATP %WT
G30S	G29	G14	(Zeman <i>et al.</i> , 2003)	+	NC	95	128
K38A	K37	K22	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	-	60	60	2
E45G	E44	E29	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	+	50	50	70
K48A	K47	K32	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	-	40	5	0
C73S	C72	C56	(Klingenberg <i>et al.</i> , 1992)	+	NC	97	40
W87Y	W86	W70	(Le Saux <i>et al.</i> , 1996)	+	NC	100	112
R96H	R95	R79	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	20	20	5
R96A			(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	0	0	0
R96P			(Nelson <i>et al.</i> , 1993)	-	NC	NC	NC
R96L			(Nelson <i>et al.</i> , 1993)	-	NC	NC	NC
R96D			(Klingenberg <i>et al.</i> , 1992)	-	NC	9	0
Y97C	Y96	Y80	(Zeman <i>et al.</i> , 2003)	+	NC	109	136
W126Y	W125	Y111	(Le Saux <i>et al.</i> , 1996)	+	NC	100	144
L142S	L141	L127	(Zeman <i>et al.</i> , 2003)	+	NC	85	119
D149S	D148	D134	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	-	46	5	0.5
R152A	R151	R137	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	-	20	20	7
S161C	S161	G145	(Dahout-Gonzalez <i>et al.</i> , 2005)	+	NC	100	100
K179M	K178	K162	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	+	100	100	120
K182I	K181	K165	(Nelson <i>et al.</i> , 1993)	+	NC	NC	NC
Y186A	Y185	Y203	(David <i>et al.</i> , 2008)	-	67	116	101
Y190A	Y189	Y207	(David <i>et al.</i> , 2008)	+	93	189	87
F191A	F190	F208	(David <i>et al.</i> , 2008)	-	50	78	0
Y194A	Y193	Y211	(David <i>et al.</i> , 2008)	+	70	62	60
R204L	R203	R187	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	0	0	0
W235F	W234	Q217	(Le Saux <i>et al.</i> , 1996)	+	NC	94	69
C244S	C243	V226	(Nelson <i>et al.</i> , 1993)	+	NC	NC	NC
P247G	P246	P229	(Klingenberg <i>et al.</i> , 1992)	+	NC	97	70
D249S	D248	D231	(Muller <i>et al.</i> , 1997)	-	20	0	0
R252I	R251	R234	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	20	20	5
R253I	R252	R235	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	15	15	2
R254I	R253	R236	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	18	20	1
C271S	C270	C256	(Nelson <i>et al.</i> , 1993)	+	NC	NC	NC
R294A	R293	R279	(Muller <i>et al.</i> , 1996)	-	50	50	50
G298S	G297	G283	(Zeman <i>et al.</i> , 2003)	+	NC	121	172

**Tableau I.1 : Récapitulatif des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur ScAnc2p.** Les mutations sont indiquées dans la première colonne (numérotation sans tenir compte de l'absence de méthionine *N*-terminale pour faire référence aux publications originales). (*) Numérotation dans la séquence de ScAnc2p en tenant compte de l'absence de méthionine *N*-terminale (**Figure I.15**). La viabilité de la souche se réfère à sa croissance sur milieu non fermentescible. Le taux d'expression de la protéine est indiqué si la mesure fait référence à une autre technique que la quantification des sites de fixations de l'ATR telle que le Western-blot ou l'ELISA. Sinon, l'indication NC (non communiqué) est précisée. Tous ces paramètres sont calculés par référence au transporteur sauvage ScAnc2p (WT).

Cependant les résidus K47 et R151 appartiennent à la séquence consensus PX(D/E)XX(K/R) et pourraient donc participer au repliement global de la protéine. Par ailleurs, le résidu R253 est retrouvé dans le motif RRR₂₅₃MMM conservé dans tout les Ancp. Il a été proposé que ce résidu puisse être impliqué dans la reconnaissance des nucléotides sur la face matricielle du transporteur (Muller *et al.*, 1996).

#### I.3.1.2.4.2 Les extrémités N/C-terminales de ScAnc2p

L'expression hétérologue des protéines bovine (bAnc1p) et humaine (HAnc1p) a été réalisée chez la levure *S. cerevisiae* (Hashimoto *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 2001c; De Marcos Lousa *et al.*, 2002). Les résultats obtenus ont montré que même si ces transporteurs étaient importés dans la mitochondrie de levure dépourvue de ses 3 isoformes du transporteur (souche *JL 1-3*), ils ne permettaient pas de restaurer sur milieu non fermentescible une vitesse de croissance des souches transgéniques proche de celle sauvage. Afin d'améliorer l'expression et l'import de ces transporteurs animaux dans les mitochondries de levure, l'extrémité N-terminale de ScAnc2p a été fusionnée à bAnc1p et HAnc1p *via* leurs régions N-terminales respectives (Hashimoto *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 2001a; Hatanaka *et al.*, 2001c). Ces études ont montré que ces chimères étaient capables de restaurer la croissance d'une souche de levure dépourvue d'Ancp endogènes, mettant en évidence un rôle de la région N-terminale de ScAnc2p dans l'import de ces transporteurs. Une autre étude a analysé l'accessibilité au solvant de cette région de ScAnc2p l'aide d'un marquage à l'éosine-5-maléimide (EMA, un réactif non perméant spécifique de la fonction thiol) d'un mutant mono-cystéine en position 20 (équivalente à la sérine 1 de bAnc1p). Les résultats obtenus n'ont pas montré de différences d'accessibilité de cette région en présence des inhibiteurs CATR ou BA, à l'inverse de ceux obtenus par immunomarquage pour bAnc1p (Hatanaka *et al.*, 2001b) (Brandolin *et al.*, 1989).

Du côté C-terminal, un autre mutant mono-cystéine, en position 311 n'a été marqué par l'EMA que dans le complexe ScAnc2p-BA (Hatanaka *et al.*, 2001b). Ce résultat suggère un changement conformationnel de cette région de ScAnc2p dans les différents complexes. Ces données complètent celles obtenues par photomarquage de ce même transporteur à l'aide d'un dérivé photoactivable d'ADP non transporté, le 2-azido-3'-O-naphtoyl-[ $\beta$ -³²P]-ADP (Dianoux *et al.*, 2000). En effet, cette étude a mis en évidence à l'aide de ce composé que la région C-terminale de ScAnc2p (de l'acide aminé I311 à l'extrémité C-terminale de la protéine) était capable de lier les nucléotides, suggérant une fonction dans le mécanisme de transport. Deux autres études plus récentes ont confirmé et complété ces résultats grâce à l'analyse phénotypique, biochimique et

conformationnelle de plusieurs mutants de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p (Clémenton *et al.*, 2008; Iwahashi *et al.*, 2008). Tout d'abord, la délétion un à un des acides aminés C-terminaux de ScAnc2p a permis de mettre en évidence que l'absence des 6 premiers acides aminés C-terminaux n'était pas critique pour la croissance. Cependant la délétion d'un acide aminé supplémentaire altère fortement la croissance des souches de levures sur un milieu non fermentescible sans pour autant modifier la quantité de protéine importée dans les mitochondries. Ces résultats confirment donc l'implication de cette région dans le mécanisme du transport (Iwahashi *et al.*, 2008). Afin d'étudier en détail son rôle, une analyse par « *cysteine-scanning* » a été réalisée sur les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA (Iwahashi *et al.*, 2008). Cette technique consiste à remplacer un à un par génie génétique les acides aminés d'une région protéique par des cystéines. L'accessibilité de ces résidus est ensuite analysée à l'aide de l'EMA. Cette étude a montré que l'extrémité C-terminale du transporteur ScAnc2p, jusqu'à l'acide aminé M309, était accessible à l'EMA dans les deux complexes (Iwahashi *et al.*, 2008). Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus précédemment *via* la même méthode pour le résidu 311 (Hatanaka *et al.*, 2001c) et mettent en évidence un manque de fiabilité dans la quantification du marquage par fluorescence de l'EMA et/ou de la protéine par Western-blot. Ils remettent donc fortement en cause cette partie des résultats. La seconde étude menée sur la caractérisation fonctionnelle de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p est décrite dans la partie **III.1.1** des résultats (**voir article 1**).

#### **I.3.1.2.4.3 Les régions transmembranaires de ScAnc2p**

Le second segment transmembranaire putatif de ScAnc2p, déduit de la structure du complexe bAnc1p-CATR, a été étudié par « *cystein-scanning* » à l'aide de l'EMA (Hatanaka *et al.*, 2001b; Kihira *et al.*, 2004; Kihira *et al.*, 2005). Il a été possible de mettre en évidence une rotation d'environ 120° de l'hélice transmembranaire 2 induite par la fixation du CATR ou du BA, exposant tour à tour au réactif les résidus 99, 100 et 103, 104 (CATR) et 99, 102 et 105 (BA) (Kihira *et al.*, 2004). Une autre étude a mis en évidence des différences d'accessibilité au niveau de la région C-terminale de cette même hélice (Kihira *et al.*, 2005). Les résultats obtenus montrent que cette région, comprise entre les acides aminés 107 et 114, est plus ou moins accessible en fonction des inhibiteurs et qu'elle présente un marquage plus important dans le complexe ScAnc2p-CATR que dans le complexe ScAnc2p-BA. Un modèle dans lequel un enfoncement de cette zone dans la membrane mitochondriale, la rendant moins accessible à l'EMA, a été proposé pour le complexe ScAnc2p-BA (Kihira *et al.*, 2005). Enfin, une étude

similaire a permis de montrer que l'extrémité *N*-terminale de l'hélice H5 (des acides aminés 222 à 229) était plus accessible dans le complexe ScAnc2p-CATR que dans le complexe ScAnc2p-BA (Iwahashi *et al.*, 2006). Cette région exposée du côté de l'espace intermembranaire semble donc subir des changements conformationnels similaires à ceux de la région de l'hélice H2 située du même côté de la membrane.

#### I.3.1.2.4.4 Les boucles cytosoliques de ScAnc2p

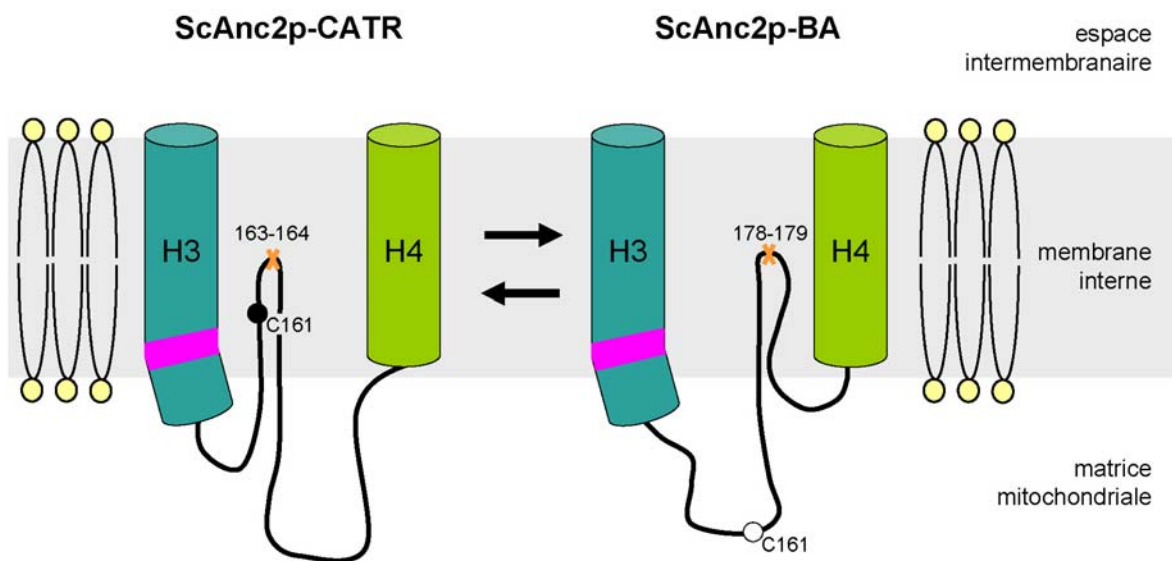
L'accessibilité des boucles cytosoliques au sein des complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA a également été investiguée par « *cysteine-scanning* » (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). Les résultats obtenus pour les boucles C1 et C2 (comprises respectivement entre les acides aminés 115-126 et 212-221 par analogie avec la structure bovine) montrent que cette région est accessible à l'EMA quel que soit l'inhibiteur utilisé (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données montrent que les différences conformationnelles observées pour la partie des hélices H2 et H5 localisées du côté de l'espace intermembranaire ne semblent pas se répercuter directement sur les boucles cytosoliques associées, quel que soit l'inhibiteur testé.

#### I.3.1.2.4.5 Les boucles matricielles de ScAnc2p

La topographie des boucles matricielles (m1, m2 et m3) a également été étudiée chez la levure. La boucle m1 contient une cystéine en position 73 (équivalente à la cystéine 56 de bAnc1p). Le marquage de cette cystéine par l'EMA montre une accessibilité de ce résidu dans le complexe ScAnc2p-BA et un masquage dans le complexe ScAnc2p-CATR. Ce résultat indique une conformation différente de cette région dans les deux complexes confirmant les données obtenues avec bAnc1p (Hatanaka *et al.*, 2001b).

Le marquage photochimique de ScAnc2p à l'aide de dérivés d'ATP photoactivables (le 2-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP et le 8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP) a permis l'identification d'une zone unique de fixation de l'ATP, localisée entre les résidus 172 et 210 (Mayinger *et al.*, 1989). Ce peptide débute dans la région *N*-terminale de la boucle m2 et se termine dans l'extrémité *C*-terminale de l'hélice H4, par référence à la structure de bAnc1p-CATR. Cette région de ScAnc2p est équivalente à l'une de celles identifiées dans bAnc1p à l'aide du 2-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ADP. Ces résultats confirment le rôle de cette région dans le mécanisme de transport (Dalbon *et al.*, 1988; Mayinger *et al.*, 1989). Une seconde étude utilisant un nouveau dérivé photoactivable, le 2-azido-3'-*O*-naphtoyl- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ADP,

a par contre mis en évidence deux sites photomarqués, l'un dans la région C-terminale de ScAnc2p, et l'autre localisé entre la boucle matricielle m2 et le début de l'hélice H4 (acides aminés 182 à 190), affinant les résultats obtenus précédemment (Mayinger *et al.*, 1989; Dianoux *et al.*, 2000). Cependant, même si un second site a été mis en évidence dans cette étude, sa localisation diffère de celle identifiée pour bAnc1p. En effet, le deuxième site photomarqué dans bAnc1p est localisé sur la boucle m3 et sur l'hélice H6 du côté matriciel alors que celui de ScAnc2p se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine, c'est-à-dire dans l'espace intermembranaire. Les données de photomarquage des protéines ScAnc2p et bAnc1p semblent donc concorder au niveau du nombre de sites mis en évidence mais des différences dans leur localisation sont relevées. Plus récemment, une étude comparative de la topologie de la boucle matricielle m2 dans les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA a été réalisée par protéolyse ménagée à la trypsine et par marquage d'un résidu cystéine exogène en position 161 (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). Dans les deux complexes, cette boucle est sensible à l'action de la trypsine sur des mitochondries fraîchement purifiées montrant étrangement une exposition de cette région du côté de l'espace intermembranaire (**Figure I.16**). Ces résultats ne sont pas en accord avec la structure du complexe bAnc1p-CATR dans laquelle la boucle m2 est située du côté matriciel, symétriquement aux boucles m1 et m3 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). L'analyse comparative des sites de coupure au sein de chaque complexe a montré qu'ils étaient distants l'un de l'autre de 15 acides aminés et situés entre les acides aminés 163-164 pour le complexe ScAnc2p-CATR et 178-179 pour ScAnc2p-BA (**Figure I.16**). En conclusion, si l'on se réfère à la structure de bAnc1p-CATR, il semblerait que cette région du transporteur ScAnc2p correspondante à la cavité soit toujours accessible du côté intermembranaire en présence des inhibiteurs. Le marquage à l'EMA de la cystéine 161 dans des mitochondries fraîchement isolées de levure n'a été possible que dans le complexe ScAnc2p-CATR. La protection de ce résidu dans le complexe ScAnc2p-BA suggère donc une exposition matricielle de cette région puisque l'EMA ne diffuse pas à travers la membrane interne (**Figure I.16**). L'ensemble de ces résultats illustre donc un mouvement de balancier de la boucle m2 permettant de passer d'une conformation à une autre mimant probablement le mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP au sein de la cavité (**Figure I.16**).



**Figure I.16 : Modèle représentant le changement de conformation de la boucle m2 de ScAnc2p en complexe avec le CATR ou le BA** (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). La croix représente le site de protéolyse par la trypsine. Le cercle représente la position d'une cystéine exogène marquée (en noir) ou pas (en blanc) par un réactif non pénétrant réagissant avec la fonction thiol des cystéines, l'EMA. La zone en rose représente la signature des membres de la MCF.

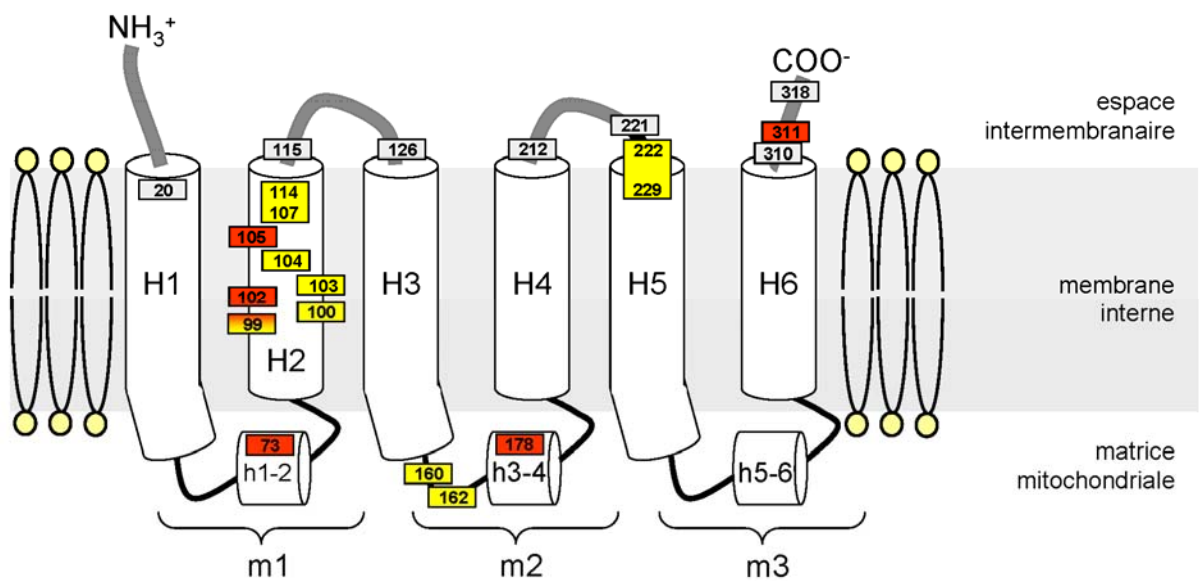


#### **I.3.1.2.4.6 Les différences conformationnelles entre les transporteurs bovin et de levure**

L'étude biochimique des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p a montré que ces protéines partagent de grandes similitudes. ScAnc2p présente donc probablement une structure proche de celle de bAnc1p (Trezeguet *et al.*, 2008). Cependant des différences importantes sont également notées et incompatibles avec la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR. Ceci vient d'être exposé pour le cas de la boucle m2 (**voir § I.3.1.2.4.5**). De plus, les données d'accessibilité de l'extrémité *N*-terminale des deux protéines bAnc1p et ScAnc2p en complexe avec les inhibiteurs sont elles aussi en contradiction (**voir § I.3.1.2.4.2**). En effet, l'extrémité *N*-terminale du transporteur bAnc1p présente des accessibilités différentes en fonction de l'inhibiteur testé contrairement à celle du transporteur ScAnc2p (Brandolin *et al.*, 1989; Hatanaka *et al.*, 2001b). Plus récemment, l'étude de la dynamique conformationnelle des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p en échange hydrogène/deutérium couplé à une analyse en spectrométrie de masse (HDX-MS) a conforté cette hypothèse et montre des différences d'accessibilité au solvant importantes entre les deux modèles, principalement pour les complexes transporteur-BA (**voir § III.1.2 des résultats, Article 2** et (Rey *et al.*, 2010a)).

#### **I.3.1.2.2.7 Résumé des variations d'accessibilité des régions de ScAnc2p en fonction des inhibiteurs CATR et BA**

Les différences conformationnelles existant entre les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA concernent plusieurs régions de la protéine probablement impliquées dans le mécanisme de transport des nucléotides. Si les différentes études ont montré que les boucles cytosoliques étaient peu modifiées dans les différents complexes, une partie des hélices H2 et H5, celle exposée dans l'espace intermembranaire, est par contre plus accessible dans le complexe ScAnc2p-CATR (Kihira *et al.*, 2005; Iwahashi *et al.*, 2006). De plus, nous pouvons noter que l'hélice H2 expose des résidus de manière alternée dans les différents complexes, suggérant une rotation de cette structure (Kihira *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données est résumé sur la **Figure I.17**. Par ailleurs, les boucles matricielles montrent elles aussi des accessibilités différentes dans les complexes CATR ou BA. La cystéine 73 est seulement accessible dans le complexe ScAnc2p-BA lors d'un marquage du côté matricielle (Hatanaka *et al.*, 2001b). Plus étrange, la liaison 178-179 de la boucle m2 est accessible du côté espace intermembranaire uniquement dans le complexe ScAnc2p-BA. A l'inverse, le coude présent entre l'hélice H3 et la



**Figure I.17 : Données d'accessibilité des différentes zones du transporteur de levure en fonction des inhibiteurs présents (CATR et BA)** Les régions et les acides aminés dont l'accessibilité a été étudiée dans les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA sont représentés par des rectangles contenant le numéro de l'acide aminé analysé (numérotation tenant compte de l'absence de méthionine). Ils sont colorés en jaune ou en rouge suivant s'ils sont accessibles dans le complexe ScAnc2p-CATR ou ScAnc2p-BA. Les régions accessibles dans les deux complexes sont représentées en gris.

boucle matricielle m2 est seulement accessible dans le complexe ScAnc2p-CATR (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005).

### I.3.2 La porine VDAC

Contrairement à la membrane interne qui est très sélective grâce à la présence de transporteurs spécifiques comme l'Ancp ou le PiC, la membrane externe est plus perméable et joue un rôle de filtre moléculaire en retenant les molécules de masse moléculaire supérieure à 3000-5000 Da (Colombini, 1989). Cette diffusion contrôlée de métabolites s'effectue au moyen de canaux transmembranaires présents en grande quantité chez tous les eucaryotes : les porines mitochondriales. Ainsi, dans le cas de la levure *S. cerevisiae*, des analyses menées après purification de l'isoforme 1 de la porine (notée ScVDAC1, forme la plus abondante) montrent que cette protéine représente au minimum 10% des protéines totales de la membrane externe mitochondriale (Forte *et al.*, 1987) et jusqu'à 50% chez *Neuraspota crassa* (Mannella et Bonner, 1975).

#### I.3.2.1 Identification et caractéristiques physiologiques de la porine

Les premières études biochimiques sur la composition protéique de la membrane externe ont montré l'existence chez plusieurs eucaryotes d'une protéine majoritaire de masse moléculaire proche de 30 kDa et de fonction inconnue (Mannella et Bonner, 1975). Ce n'est qu'en 1976, après reconstitution dans une membrane artificielle, et à cause de ses caractéristiques électrophysiologiques, qu'elle a été identifiée dans l'organisme unicellulaire *Paramecium aurelia* (Schein *et al.*, 1976) et nommée pour la première fois VDAC pour « Voltage Dependent Anion Channel ». Par la suite, la porine a été identifiée chez le rat, le bœuf, la levure *S. cerevisiae* et le champignon filamenteux *N. crassa* (Colombini, 1979), puis chez d'autres organismes eucaryotes, toujours avec des caractéristiques biochimiques et biophysiques hautement conservées (De Pinto *et al.*, 1987). De manière surprenante, VDAC a également été retrouvée dans des membranes non mitochondriales de cellules mammifères, en l'occurrence chez l'homme dans les membranes plasmiques des lymphocytes B mais aussi dans les membranes du réticulum sarcoplasmique des muscles striés squelettiques (Bathori *et al.*, 2000).

Les expériences d'électrophysiologie menées sur la protéine reconstituée, soit en liposomes, soit en bicouches lipidiques planes, montrent que le VDAC contrôle le flux de métabolites grâce à des variations de fréquence d'ouverture du canal suivant le potentiel de membrane (Colombini,

2004). Il existe ainsi un état dit « ouvert », légèrement sélectif vis-à-vis des anions. Ce dernier est caractérisé par une perméabilité élevée et par la présence de larges pores remplis d'eau de 2-3 nm de diamètre environ observés en microscopie électronique à transmission (Mannella, 1998). A l'inverse, à partir d'une différence de potentiel de membrane supérieure à 30 mV, il est possible de distinguer plusieurs états dits « fermés », pour lesquels la perméabilité est réduite, n'autorisant alors plus le passage des anions tels que l'ADP ou l'ATP. Il a été montré *in vitro* que l'ouverture du canal semble être régulée par des molécules variées, telles que le glutamate et le NADH (Shoshan-Barmatz et Gincel, 2003). Même si ces expériences d'électrophysiologie constituent un véritable test de fonctionnalité de la porine mitochondriale permettant de mettre en évidence certaines molécules influant sur l'ouverture ou la fermeture du canal, il semble important de rappeler qu'*in vivo* la membrane externe ne serait pas soumise à un potentiel membranaire de par sa nature perméable bien que certains travaux attestent du contraire (Liu et Colombini, 1992; Lemeshko et Lemeshko, 2000; Lemeshko et Lemeshko, 2004).

### I.3.2.2 Les différents isoformes de la porine

Les porines mitochondriales sont des protéines retrouvées chez les organismes eucaryotes, légèrement basiques, d'environ 30 kDa. Elles sont caractérisées par des séquences primaires d'environ 280 acides aminés qui présentent cependant un pourcentage d'homologie relativement faible. Chez les mammifères et en particulier chez l'homme, il existe trois isoformes de la porine (hVDAC1, hVDAC2 et hVDAC3). Même si ces trois isoformes présentent plus de 80% d'homologie de séquences, leurs rôles physiologiques, leurs propriétés électrophysiologiques sont bien distincts, ainsi que leurs distributions et leurs abondances au sein de différents types cellulaires (Xu *et al.*, 1999; Sampson *et al.*, 2001; Cesar Mde et Wilson, 2004; Hinsch *et al.*, 2004). hVDAC2 est l'isoforme dominant exprimé dans le cerveau (Cesar Mde et Wilson, 2004). Il présente des caractéristiques d'ouverture du canal semblables à hVDAC1 (Xu *et al.*, 1999). hVDAC3 est l'isoforme le moins bien caractérisé. Il apparaît avoir des propriétés d'ouverture du canal caractéristique et une perméabilité aux métabolites réduite par rapport aux deux autres isoformes (Xu *et al.*, 1999). L'isoforme hVDAC1 est de loin le plus étudié. Cette porine présente des propriétés électrophysiologiques fondamentales qui incluent la conductance, la sélectivité et la dépendance au voltage remarquablement bien conservées, de la levure aux mammifères (De Pinto *et al.*, 1987; Colombini, 1989). Codées par le génome nucléaire mais dépourvues de séquence signal, les porines sont prises en charge par des chaperonnes cytosoliques puis

reconnues par le complexe d'import Tom de la membrane externe mitochondriale avant d'être insérées dans cette même membrane par le complexe TOB (**Figure I.9**).

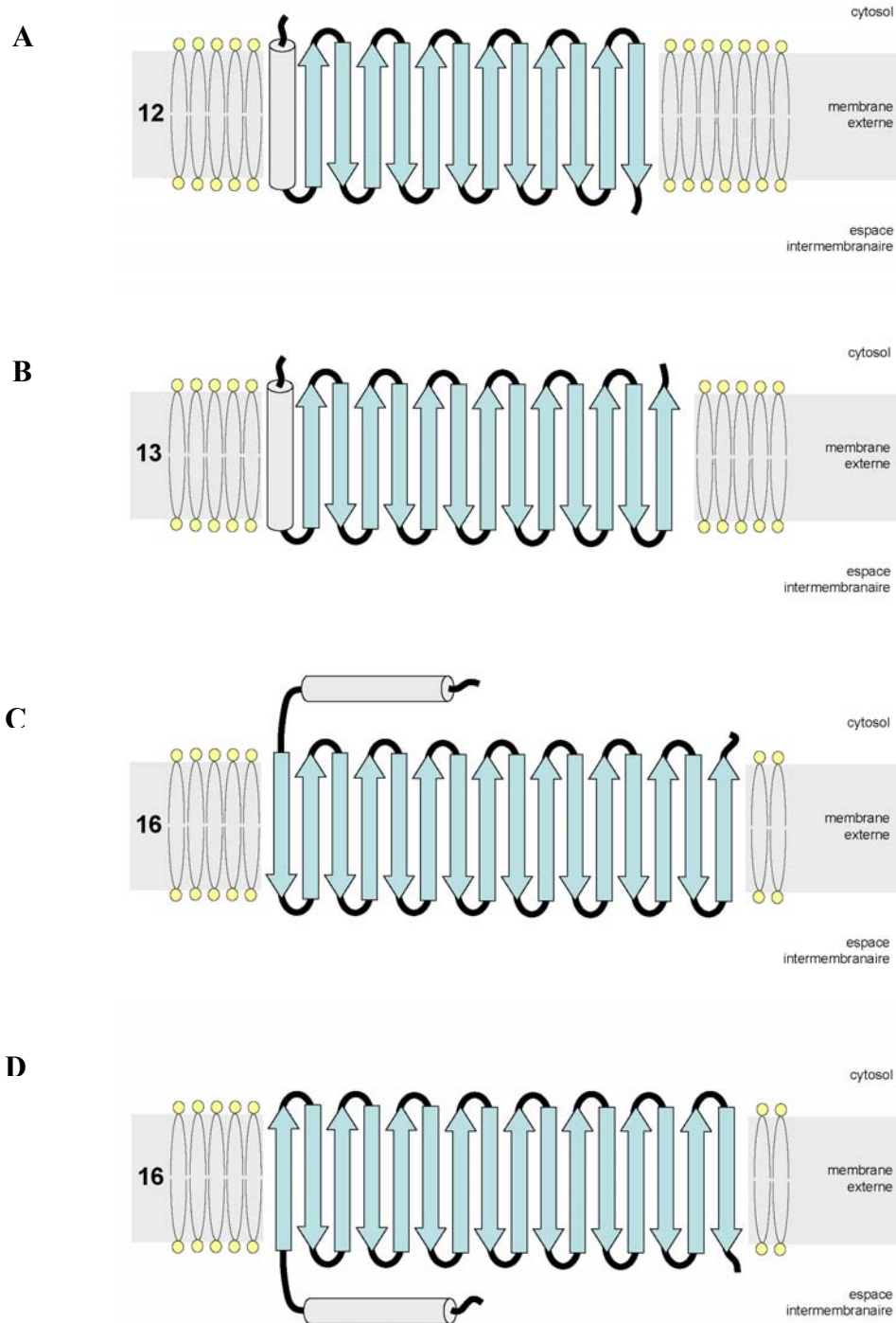
Suivant les espèces, il peut exister plusieurs isoformes de VDAC et il est intéressant de noter que plus l'organisme est complexe, plus le nombre d'isoforme est élevé. Ainsi, on distingue une seule isoforme chez *N. crassa* tandis que la souris en compte deux et l'homme trois. Dans la levure *S. cerevisiae*, on distingue deux isoformes de la porine. La plus abondante, et donc la plus étudiée, est l'isoforme 1 (notée ScVDAC1) qui est codée par le gène nucléaire *POR1* (Forte *et al.*, 1987). L'isoforme 2 (notée ScVDAC2) codée par le gène *POR2* présente 50% d'identité de séquence avec ScVDAC1 (Blachly-Dyson *et al.*, 1997). Contrairement à cette dernière isoforme, ScVDAC2 n'est pas ou très peu exprimée dans la mitochondrie quelles que soient les conditions de culture et présente une faible perméabilité aux métabolites (Lee *et al.*, 1998). Contrairement à l'Ancp et au PiC, ScVDAC1 et ScVDAC2 ne sont pas indispensables au développement des levures sur un milieu fermentescible ou non (Dihanich *et al.*, 1987; Michejda *et al.*, 1990; Blachly-Dyson *et al.*, 1997).

### I.3.2.3 Modèles de topologie de la porine dans la membrane

La découverte de la structure 3D à haute résolution de la porine VDAC est très récente (2008). Auparavant, pendant plusieurs décennies, cette porine a fait l'objet d'études biochimiques et biophysiques afin de comprendre sa structure dans les membranes de la mitochondrie. Sur la base d'analogie entre leurs profils respectifs d'hydropathie, il a été proposé que les porines VDAC présentent une structure en tonneau  $\beta$  similaire à celle des porines bactériennes. Cette hypothèse a été par la suite confirmée par des études en dichroïsme circulaire (Shao *et al.*, 1996), en spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (Abrecht *et al.*, 2000) et en diffraction électronique à moyenne résolution de cristaux bidimensionnels (pour revue : (Mannella, 1998)). L'identification des feuillets transmembranaires a permis de mieux définir la structure du VDAC. Les premiers travaux, ayant pour objectif d'identifier les feuillets  $\beta$  transmembranaires, se sont basés sur l'homologie de séquence des porines VDAC à celle des porines bactériennes (Omp) ainsi que sur l'utilisation d'algorithmes de prédictions de structures secondaires (Vogel et Jahnig, 1986; Jeanteur *et al.*, 1991; Haris et Chapman, 1992; Rauch et Moran, 1994; Thinner et Reymann, 1997; De Pinto *et al.*, 2008). Cependant, cette homologie est loin d'être significative. Si elle donne une information sur la présence de feuillets, elle ne permet pas avec précision d'identifier les véritables régions transmembranaires. En effet, on ne peut pas ignorer la distance évolutive gigantesque qui subsiste entre ces deux familles de canaux qui ont été soumises à des

pressions de sélections environnementales radicalement différentes. Ainsi ces prédictions sont à prendre avec précaution.

Même si aujourd'hui des approches structurales ont permis de caractériser des structures 3D à haute résolution du VDAC, des désaccords semblent persister dès lors qu'il s'agit de déterminer la topographie exacte de la porine dans les membranes, le nombre et l'orientation des feuillettes  $\beta$  qui constituent le tonneau (pour revue : (Colombini, 2009)). Les modèles proposés dans la littérature, pourtant basés sur des analyses de séquence et confortés par diverses approches expérimentales, sont tous très différents. Ils sont résumés dans la **Figure I.18**. Un premier modèle, proposé pour les porines de plusieurs eucaryotes sur la base d'analyses de séquences primaires (Song et Colombini, 1996), décrit 12 feuillettes  $\beta$  formant le tonneau (**Figure I.18A**). De plus, il existerait une courte hélice  $\alpha$  portée par l'extrémité *N*-terminale, mais décrite ici comme étant transmembranaire. Ce modèle corrobore celui décrit auparavant pour la porine ScVDAC1 via une approche de mutagenèse dirigée (Blachly-Dyson *et al.*, 1990). Un autre modèle (**Figure I.18B**), qui se distingue du premier, a été proposé en 1998 grâce à des travaux combinant des approches biochimiques et de biologie moléculaire sur la porine de *N. crassa*, (Song *et al.*, 1998). Ainsi, des paires de résidus cystéine ont été introduites dans la séquence primaire de la porine ; elles ont été ensuite biotinylées puis leur accessibilité a été analysée à l'aide de streptavidine. Cette technique de marquage permet de déterminer si les résidus cystéine sont du même côté ou non de la membrane. Il en résulte un modèle présentant un tonneau constitué de 13 feuillettes  $\beta$  portant une courte hélice  $\alpha$  transmembranaire à l'extrémité *N*-terminale. Plus récemment, ce modèle a été remis en question puisque l'analyse de mutants de la porine de *N. crassa* par des approches combinant l'électrophysiologie à des données biophysiques (dichroïsme circulaire et fluorescence intrinsèque des tryptophanes) a permis de décrire un tonneau formé de 16 feuillettes  $\beta$  associé à une l'hélice  $\alpha$  exposée du côté de l'espace intermembranaire (Runke *et al.*, 2006) (**Figure I.18C**). Un modèle similaire dont l'extrémité *N*-terminale était cette fois-ci cytosolique avait été auparavant décrit sur la base d'une simple analyse de séquences de porines (Casadio *et al.*, 2002) (**Figure I.18D**). Enfin, les données cristallographiques disponibles à basse résolution (environ 8 Å) pour la porine humaine VDAC1 ont confirmé la présence de pores dont le diamètre était compatible avec un nombre de feuillettes  $\beta$  pouvant varier entre 12 et 16 (Dolder *et al.*, 1999). Ainsi, il n'existe toujours aucun consensus, bien que le modèle présenté sur la **Figure I.18B** (13 feuillettes  $\beta$ ) soit privilégié (Colombini, 2009).



**Figure I.18 : Différents modèles topologiques proposés pour les porines mitochondriales.** Dans cette figure, les différents feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches et leur nombre est indiqué. L'hélice N-terminale est symbolisée par un cylindre localisé selon les auteurs dans l'espace intermembranaire ou dans la matrice voir même dans la membrane. **(A)** d'après (Blachly-Dyson *et al.*, 1990; Song et Colombini, 1996). **(B)** d'après (Song *et al.*, 1998). **(C)** d'après (Runke *et al.*, 2006). **(D)** d'après (Casadio *et al.*, 2002).

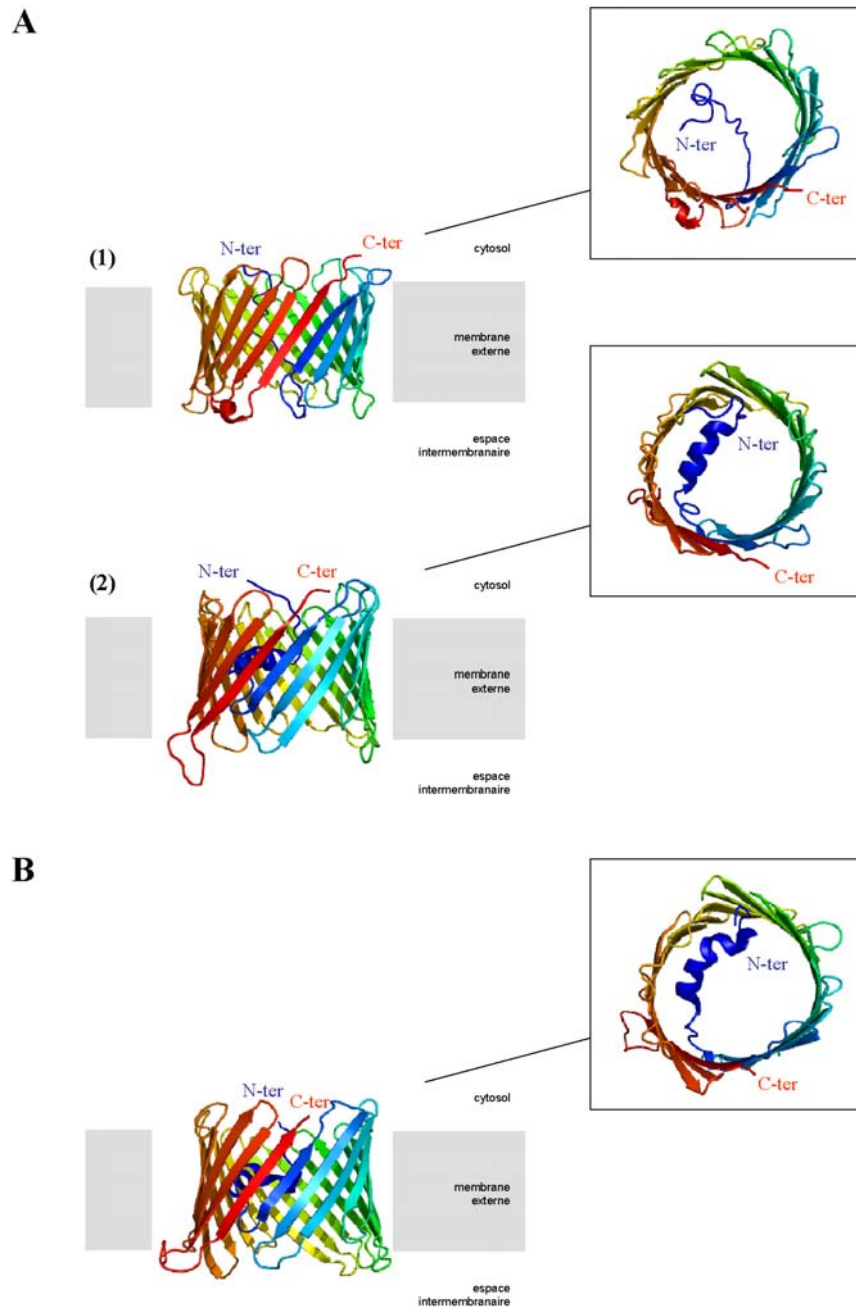
### I.3.2.4 Structures 3D à hautes résolutions de la porine

D'un point de vue structural, la porine peut être divisée en deux parties. D'une part le canal transmembranaire relativement peu mobile constitué de 19 feuillets  $\beta$  antiparallèles, et d'autre part d'une extension *N*-terminale « soluble » d'une vingtaine d'acides aminés repliés semble-t-il en hélice  $\alpha$  et relié par une charnière peptidique au tonneau  $\beta$ . Leur structure respective est discutée ci-après.

#### I.3.2.4.1 Le canal transmembranaire en tonneau $\beta$

La structure 3D à haute résolution des porines VDAC1 humaine et murine (hVDAC1 et mVDAC1) ont récemment été déterminées (**Figure I.19**) (Bayrhuber *et al.*, 2008; Hiller *et al.*, 2008; Ujwal *et al.*, 2008). Chacune de ces structures a été obtenue *via* une approche similaire qui repose sur l'expression exogène du VDAC1 dans la bactérie *E. coli* sous la forme de corps d'inclusion suivie de sa renaturation en présence de détergent. L'objectif est d'obtenir suffisamment de protéines nécessaires aux étapes préalables de mise au point (grandes consommations de protéine) en vue d'aborder la détermination de la structure 3D en cristallographie aux rayons X et en spectroscopie de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Hiller et ses collaborateurs ont été les premiers à résoudre par spectroscopie de RMN la structure à haute résolution de la porine hVDAC1 en solution dans le détergent LDAO (Lauryldiméthylamine-oxyde) (Hiller *et al.*, 2008). Bayrhuber et ses collaborateurs ont, quant à eux, utilisés une approche combinant la spectroscopie de RMN et la cristallographie aux rayons X afin d'obtenir une structure cependant moins résolue (4Å) de la porine hVDAC1 dans le détergent Cymal-5 (Bayrhuber *et al.*, 2008). Enfin, le groupe d'Abramson a déterminé la structure cristallographique à haute résolution (2,3Å) du VDAC1 murin solubilisé en présence d'un lipide, le 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine et du détergent CHAPSO (Ujwal *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que les trois structures résolues sont relativement identiques. En effet, les porines humaine et murine s'organisent en tonneau  $\beta$  constitué de 19 feuillets antiparallèles dont les extrémités *N*- et *C*-terminales s'orientent du côté cytosolique classant les porines mitochondriales dans une nouvelle famille de porine (Hiller *et al.*, 2008). L'une des différences majeures entre ces structures concerne la région *N*-terminale qui décrit une hélice  $\alpha$  (dans 2 des 3 structures résolues) mais dont l'orientation à l'intérieur du canal fait l'objet de différences (**Figure I.19**).





**Figure I.19 : Structures des porines VDAC1 mitochondriales.** (A) Isoforme 1 de la porine humaine obtenue en spectroscopie de RMN (Hiller *et al.*, 2008) (1) et par une approche combinant à la fois la spectroscopie de RMN et la cristallographie aux rayons X (4Å de résolution) (Bayrhuber *et al.*, 2008) (2). (B) Structure à haute résolution (2,3Å) de l'isoforme 1 de la porine murine résolue par cristallographie aux rayons X (Ujwal *et al.*, 2008). L'ensemble de ces structures présente un canal formé de 19 feuilletts  $\beta$  transmembranaires anti-parallèles dont les extrémités *N*- et *C*-terminales s'orientent vers le cytosol. Ces structures classent les protéines VDAC dans une nouvelle famille de porines. L'extrémité *N*-terminale forme une structure organisée (hélice  $\alpha$ ) ou non dont l'orientation diffère d'un modèle à un autre.

La structure 3D à haute résolution de la porine hVDAC1 montre un pore, de forme légèrement concave, ayant pour dimension horizontale environ 3,5 x 3,1 nm pour 4 nm de hauteur (Bayrhuber *et al.*, 2008). Ces données sont similaires à celles obtenues en spectroscopie de RMN (Hiller *et al.*, 2008), en AFM à haute résolution (Goncalves *et al.*, 2007) et en cryo-microscopie électronique (Guo et Mannella, 1993). Le diamètre interne du pore est d'approximativement 1,5 x 1 nm et constitue un espace suffisant au passage de petits métabolites (Bayrhuber *et al.*, 2008). L'ensemble des données de la littérature lié aux dimensions du pore est résumé dans le **Tableau I.2.**

#### **I.3.2.4.2 L'extrémité N-terminale de la porine**

Quelles que soient les structures du VDAC1 obtenues en spectroscopie de RMN ou en cristallographie aux rayons X, elles s'accordent sur le fait que leurs extrémités N-terminales n'interviennent pas dans la constitution du tonneau à proprement parlé mais diverge dans son orientation et sa structure à l'intérieur du canal (**Figure I.19**). Ces différences sont discutées en détails dans la partie décrivant le mécanisme du transport (§ I.3.2.6.2).

#### **I.3.2.5 Les structures 3D de la porine sont elles natives ou non?**

Les structures 3D à haute résolution du VDAC1 obtenues soit en spectroscopie de RMN soit en cristallographie aux rayons X, sont actuellement remises en cause (Colombini, 2009). En effet, il apparaît que les propriétés structurales et fonctionnelles des VDAC1 cristallisés présentent des différences significatives par rapport aux modèles proposés dans la littérature pendant les 20 dernières années (Colombini, 2009; Summers et Court, 2010) (**Figure I.18**). Le principal débat concerne l'étape de renaturation des protéines à partir des corps d'inclusion produits dans les bactéries. L'une des questions soulevée par Colombini, un pionnier dans l'étude de la porine mitochondriale, est de savoir si la porine renaturée est dans une conformation native fonctionnelle ou dans un autre état conformationnel, finalement artificiel, imposé par le processus de renaturation. Il a ainsi été montré que des propriétés du VDAC1 qui concernent la conductance et la sélectivité du canal, admises depuis plus de 30 ans, n'étaient pas conservées *via* cette méthode de production et de renaturation de la protéine (Hiller *et al.*, 2008). Elles sont néanmoins restaurées en ajoutant du cholestérol et du Triton X100 au moment de la renaturation (Hiller *et al.*, 2008). Cependant, l'utilisation de ces effecteurs est incompatible pour des raisons expérimentales avec une approche cristallographique car ils réduisent les contacts protéine/protéine à la base de la formation des cristaux.

Type de porine ( <i>organisme</i> )	Taille du pore	Méthodes de mesure utilisées	Références bibliographiques
NcVDACp ( <i>Neurospora crassa</i> )	2 nm (Ø)	Bicouche lipidique plane	(Colombini, 1980)
NcVDACp ( <i>Neurospora crassa</i> )	1,8 nm (Ø)	Bicouche lipidique plane	(Freitag <i>et al.</i> , 1982a)
NcVDACp ( <i>Neurospora crassa</i> )	2-3 nm (Ø)	Microscopie Electronique (ME)	(Mannella, 1982)
ScVDAC1p ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	1,7 nm (Ø)	Bicouche lipidique plane	(Ludwig <i>et al.</i> , 1988)
NcVDACp ( <i>Neurospora crassa</i> )	~3.8 nm (Ø)	Cryo-électro microscopie de cristaux bidimensionnels	(Guo et Mannella, 1993)
hVDAC1p ( <i>Homo sapiens</i> ) exprimé chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,3 nm (Ø)	Bicouche lipidique plane	(Blachly-Dyson <i>et al.</i> , 1994)
hVDAC1p ( <i>Homo sapiens</i> )	3,7 nm (D) ; 1,7-2 nm (d)	Cryo-électro microscopie de cristaux bidimensionnels	(Dolder <i>et al.</i> , 1999)
ScVDAC1p ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	3,8 nm x 2,7 nm (Ø)	Microscopie à Force Atomique (AFM)	(Goncalves <i>et al.</i> , 2007)
hVDAC1p ( <i>Homo sapiens</i> )	2,5 nm (Ø)	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	(Hiller <i>et al.</i> , 2008)
hVDAC1p ( <i>Homo sapiens</i> )	3,5x3,1 nm (D) ; 1,5x1 nm (d)	RMN et Cristallographie en Rayon X	(Bayrhuber <i>et al.</i> , 2008)
mVDAC1p ( <i>murins</i> )	2,7x2,4 nm (D) ; 2,7x1,4 nm (d)	Cristallographie en Rayon X	(Ujwal <i>et al.</i> , 2008)

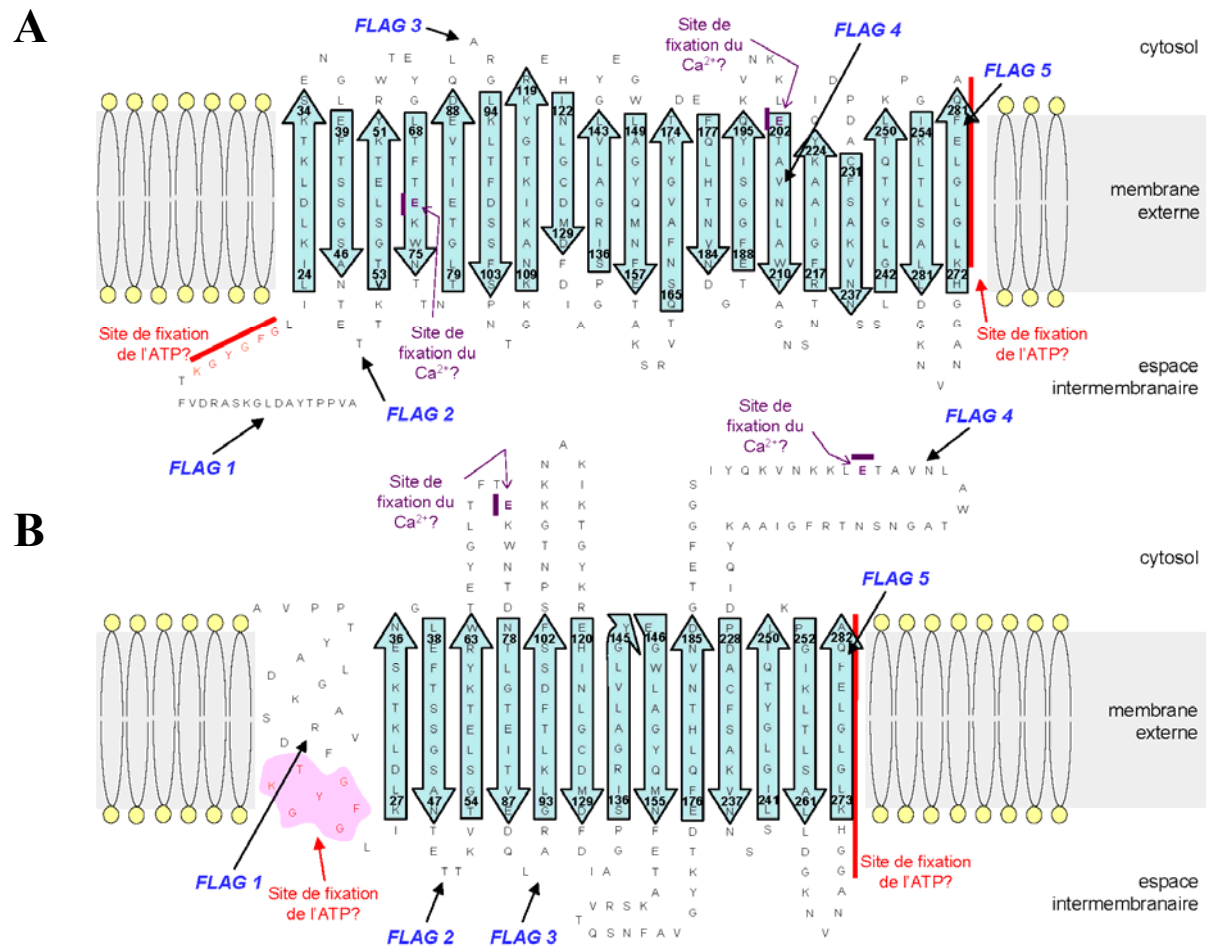
**Tableau I.2 : Estimations du diamètre du pore au cours de ces 30 dernières années.** Ce tableau présente le diamètre (Ø) moyen du pore (nm). Dans certains cas le pore a été caractérisé comme ovoïde de diamètres variables : ses diamètres externe (D) et interne (d) sont alors indiqués (D'après (Summers et Court, 2010)).

Les travaux de l'équipe d'Abramson montrent une conservation des propriétés fonctionnelles du VDAC murin après production en bactérie, renaturation et reconstitution en liposome (Ujwal *et al.*, 2008). Or, il est reconnu que seule une infime fraction de la protéine s'insère vraiment dans les membranes après reconstitution (1 molécule pour 100 millions) et ne peut en aucun cas refléter les propriétés biochimiques de l'ensemble de la population en porine (Colombini, 2009). En effet, les études structurales concernent en général la plus grande population de molécules alors que les études fonctionnelles mesurent uniquement les propriétés des canaux qui sont insérés. Cette différence est essentielle. En résumé, les structures 3D des porines animales obtenues récemment restent controversées.

Afin de donner des éléments de réponse à ce problème, des étiquettes « *FLAG* » ont été introduites judicieusement dans la séquence primaire de la porine ScVDAC1 en se basant sur sa topographie prédite à partir des structures 3D des porines humaine et murine (**Figure I.20A**) (McDonald *et al.*, 2009). La porine a ensuite été immunodétectée *in organello* ou après lyse des mitochondries à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette étiquette. Les résultats obtenus montrent que l'étiquette « *FLAG 2* » insérée entre les feuillets  $\beta 2$  et  $\beta 3$  du tonneau est uniquement accessible du côté de l'espace intermembranaire en accord avec les structures 3D connues de porine (McDonald *et al.*, 2009). Une même remarque est formulée pour l'étiquette « *FLAG 5* » placée dans l'extrémité C-terminale de la porine (McDonald *et al.*, 2009). Par contre, les étiquettes « *FLAG 3* » et « *FLAG 4* » localisées respectivement entre les feuillets  $\beta 5$  et  $\beta 6$  ou dans le feuillet  $\beta 14$  montrent une orientation, vers le côté intermembranaire pour la première et cytosolique pour la seconde. Ce résultat est en désaccord avec les structures 3D publiées de porine (McDonald *et al.*, 2009). Enfin, le « *FLAG 1* » inséré en position 11 n'est pas accessible aux anticorps. Une localisation membranaire ou à l'intérieur du tonneau a alors été suggérée (McDonald *et al.*, 2009). Or, la région N-terminale est le principal élément antigénique chez la porine ScVDAC1 (De Pinto *et al.*, 1991). L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un nouveau modèle présenté dans la **Figure I.20B**.

### I.3.2.6 Le mécanisme moléculaire d'ouverture et fermeture du pore

Bien quelle fasse l'objet de controverse, les structures 3D du VDAC récemment obtenues s'avèrent être un atout majeur dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le transport des petits métabolites tels que l'ADP, l'ATP et le  $P_i$  à travers la membrane externe de la mitochondrie. Ce mécanisme semble aujourd'hui susciter un vif intérêt.



**Figure I.20 : Modèle de repliement dans la membrane externe mitochondriale du VDAC1 humain .(A) d'après les données structurales de spectroscopie de RMN et (B) d'après celles déduites d'études fonctionnelles issues d'approches biochimiques d'après (Colombini, 2009). Les sites présumés de fixation de l'ATP (séquence soulignée en rouge) ainsi que l'emplacement des FLAG 1 à 5 peptidiques utilisés récemment pour retopographier la porine sont indiqués (McDonald *et al.*, 2009).**

En effet, plusieurs modèles sont actuellement proposés dans la littérature, tous basés sur les premières expériences réalisées en bicouches lipidiques planes qui ont montrées des états « ouvert » et « fermé » de la porine dépendant du voltage (Schein *et al.*, 1976). Ces modèles s'accordent tous sur un même principe de base mettant en jeu des changements conformationnels de la paroi du tonneau et des mouvements de l'extrémité *N*-terminale.

#### **I.3.2.6.1 L'implication du tonneau $\beta$**

Il a d'abord été proposé que le mécanisme d'ouverture et de fermeture du pore implique le réarrangement des feuilletts transmembranaires (Colombini, 1989; Peng *et al.*, 1992). La flexibilité des feuilletts  $\beta$  constituant le tonneau a été suggérée dans différents travaux *via* des approches biochimiques (Colombini, 2009). Cette hypothèse a été confortée grâce aux données structurales, en particulier, celles obtenues en spectroscopie de RMN. En effet, les auteurs de ces travaux ont identifié une vingtaine de conformères structuraux qui se distinguent principalement par la forme circulaire ou ovoïde du tonneau. Ces analyses de la porine hVDAC1 solubilisée en LDAO ou en Cymal-5, montrent un échange rapide des protons des liaisons amides des feuilletts  $\beta 1$  à  $\beta 4$  (Bayrhuber *et al.*, 2008; Hiller *et al.*, 2008). Ce résultat illustre des mouvements moléculaires de cette région de la protéine, ce qui implique une rupture transitoire des liaisons hydrogènes (Bayrhuber *et al.*, 2008). L'hypothèse selon laquelle le mouvement de l'extrémité *N*-terminale du VDAC1 serait capable de fournir l'énergie requise pour le réarrangement de ces liaisons hydrogènes a été proposée (Bayrhuber *et al.*, 2008). Cependant, gardons à l'esprit que ces structures ont été obtenues en micelles de détergent, et donc, en absence d'une certaine rigidité induite par les contraintes de pression latérale normalement exercées par la membrane externe. Ces différences d'environnement pourraient alors expliquer la dynamique conformationnelle observée.

#### **I.3.2.6.2 L'implication de l'extrémité *N*-terminale**

Les modèles les plus récents basés principalement sur des données structurales suggèrent l'implication de l'extrémité *N*-terminale du VDAC dans le mécanisme d'ouverture et fermeture du pore. Cependant quelques divergences apparaissent. En effet, les données obtenues en spectroscopie de RMN et en cristallographiques aux rayons X divergent et montrent des différences dans l'organisation et l'orientation de l'extrémité *N*-terminale à l'intérieur du canal (**Figure I.18**). La raison de ces différences n'est pas claire mais peut être potentiellement liée aux

contraintes expérimentales. En effet, les porines humaines et murines exprimées chez *E. Coli* divergent dans la position *N*- ou *C*-terminale de la queue poly histidine nécessaire à leur purification à partir de corps d'inclusion renaturés. A cette différence importante s'ajoute les diverses méthodes utilisées lors de l'étape de renaturation. En effet, la porine humaine (Bayrhuber *et al.*, 2008; Hiller *et al.*, 2008) est pourvue d'une queue poly histidine en position *C*-terminale et sa renaturation a été réalisée à pH 6,8, alors que le VDAC1 murin comporte cette extension à son extrémité *N*-terminale et a été cristallisé à pH 8,5 (Ujwal *et al.*, 2008)

Le rôle de la région *N*-terminale dans le mécanisme d'ouverture et de fermeture du pore a également été investigué par mutagenèse dirigée. Ainsi, des délétions ont concerné l'ensemble (environ les 20 premiers acides aminés) ou une partie de ce domaine *N*-terminal (les 12 premiers acides aminés) (Popp *et al.*, 1996; Koppel *et al.*, 1998). L'analyse des propriétés électrophysiologiques des porines mutées, en l'occurrence celle de *S. cerevisiae*, a montré la présence de canaux présentant des signaux électriques de transition très affectés entre les différents états « ouvert » et « fermé » du canal. L'importance de l'extrémité *N*-terminale dans le mécanisme d'ouverture et de fermeture du pore a cependant été remise en cause récemment. Un mutant de la porine mVDAC1 dépourvu des 26 premiers acides aminés complémente parfaitement des souches de cellules humaines dont le VDAC endogène avait été éteint par ARN interférant (Abu-Hamad *et al.*, 2009). Ce résultat surprenant suggère ainsi que le domaine *N*-terminal n'est pas essentiel dans la fonction principale de transport de petits solutés du VDAC (Abu-Hamad *et al.*, 2009). Par contre, les auteurs de ce travail montrent que le VDAC joue par l'intermédiaire de son domaine *N*-terminal un rôle essentiel de médiateur dans l'apoptose d'origine mitochondriale. En effet, ce domaine serait impliqué dans le relargage du cytochrome *c* dans le cytoplasme et dans la reconnaissance de protéines anti-apoptotiques telles que l'hexokinase et Bcl2 (Abu-Hamad *et al.*, 2009).

#### I.3.2.6.3 Les régions « senseur » du voltage

Le mécanisme d'ouverture du canal dépendant du voltage implique l'existence d'un ou plusieurs domaines « senseur ». Ce phénomène est cependant abolit à faible pH et par modifications de groupes amines en carboxyles, suggérant que des résidus chargés positivement seraient impliqués dans le dispositif « senseur » du voltage (Thomas *et al.*, 1993). Basés sur cette observation, des résidus chargés présents dans la porine de *S. cerevisiae* ont été individuellement remplacés par mutagenèse dirigée par un résidu de charge opposée (Thomas *et al.*, 1993). Toujours dans le même objectif d'identifier les régions « senseur », et donc les acides aminés impliqués dans

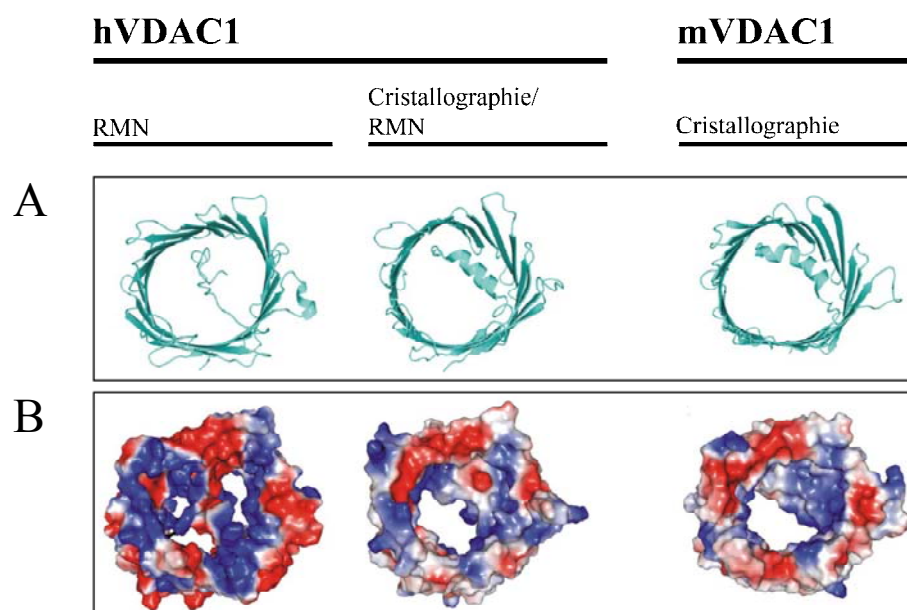
l'ouverture et la fermeture du pore, une autre approche concernait la mutation de certains résidus du VDAC de *N. crassa* par des cystéines afin de les marquer dans différentes conditions électrophysiologiques à la streptavidine après biotinylation (Song *et al.*, 1998). L'ensemble des résultats obtenus à l'aide de ces deux études est résumé dans le **Tableau I.3**. On peut noter que les résidus *N*-terminaux aux positions 7, 12, 15, 19 et 23 dans la porine de *N. crassa* semblent jouer un rôle dans le mécanisme d'ouverture et fermeture du canal dépendant du potentiel de membrane. Ces résultats sont en accord avec l'idée que l'extrémité *N*-terminale de la porine soit impliquée dans le mécanisme d'ouverture et fermeture du pore *via* un mouvement moléculaire. Cependant, d'autres résidus principalement localisés dans les feuillets  $\beta 2$  à  $\beta 5$ ,  $\beta 10$  à  $\beta 13$  et  $\beta 19$  semblent également avoir une importance dans ce mécanisme. Par contre, les acides aminés proposés comme n'étant pas impliqués, se localisent plutôt au niveau des différentes boucles reliant les feuillets  $\beta$  mais également dans les feuillets  $\beta 1$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 14$ ,  $\beta 16$  et  $\beta 18$ . Un mutant de la porine NcVDAC1 dépourvue des acides aminés NDRGV (boucle cytosolique après le feuillet  $\beta 16$ ) présente des propriétés électrophysiologiques équivalentes à celles de la protéine sauvage (Runke *et al.*, 2006). Ces résultats sont en accord avec ceux de Song et ses collaborateurs puisque cette région peptidique inclut le résidu arginine 240 dont la mutation n'affecte pas le mécanisme d'ouverture et de fermeture du pore (**Tableau I.3**).

Les données structurales actuelles positionnent l'extrémité *N*-terminale du VDAC à l'intérieur du pore. Il a été proposé que cette partie de la protéine soit en contact avec des composants du « capteur » du voltage localisés dans le tonneau. L'analyse en spectroscopie de RMN de hVDAC1 suggère que les résidus 7-10 sont impliqués dans des contacts NOE (« *Nuclear Overhauser effect* ») avec une région hydrophobe du tonneau, plus spécifiquement les résidus V143 (feuillet  $\beta 9$ ) et L150 (feuillet  $\beta 10$ ) (Hiller *et al.*, 2008). Dans cette structure, le segment *N*-terminal divise en deux la lumière du pore (**Figure I.21**). Il a été proposé qu'elle corresponde à un état « fermé » puisque le diamètre du pore est alors réduit par rapport aux autres structures qui sont résolues. En effet, les structures cristallographiques des porines mVDAC1 et hVDAC1 ont une portion de l'extrémité *N*-terminale placée horizontalement contre la paroi du tonneau, parallèle à la membrane externe. Cette localisation a deux conséquences : i), d'une part, le diamètre du pore apparaît plus important (**Figure I.21**); ii), d'autre part, la répartition électrostatique est modifiée au profit d'une charge globale du pore positive (**Figure I.21**). Il a donc été proposé que ces deux structures correspondent vraisemblablement à des états « ouverts » du pore sélectif aux anions du côté cytosolique (Bayrhuber *et al.*, 2008) (Ujwal *et al.*, 2008).



Résidus mutés	Résidus équivalents chez (Sc) ou (Nc) à titre indicatif	Résidus équivalents chez hVDAC1	Positions présumées dans la structure hVDAC1
<b>Résidus impliqués dans le mécanisme d'ouverture/fermeture du pore</b>			
S7 (Nc) ^a	S7 (Sc)	A8	Région N-terminale
S12 (Nc) ^a	N12 (Sc)	S13	Région N-terminale
D15 (Sc) ^b	D15 (Nc)	D16	Région N-terminale
K19 (Sc) ^b	K19 (Sc)	K20	Région N-terminale
H23 (Nc) ^a	H23 (Sc)	G23	Région N-terminale
K46 (Sc) ^b	K46 (Nc)	S46	β2
T53 (Nc) ^b	L54 (Sc)	V54	β3
E58 (Nc) ^b	E59 (Sc)	E59	β3
K61 (Sc) ^b	K60 (Nc)	K61	β3
K65 (Sc) ^b	K65 (Nc)	T65	Boucle après β3
T69 (Nc) ^a	G70 (Sc)	T70	β4
A79 (Nc) ^a	N80 (Sc)	T80	β5
K84 (Sc) ^b	K84 (Nc)	E84	β5
E152 (Sc) ^b	S152 (Nc)	Q154	β10
T183 (Nc) ^a	T182 (Sc)	N183	β12
S190 (Nc) ^a	T190 (Sc)	G191	β13
E282 (Nc) ^a	D282 (Sc)	Q282	β19
<b>Résidus non impliqués dans le mécanisme d'ouverture/fermeture du pore</b>			
D30 (Sc) ^b	E30 (Nc)	D30	β1
N38 (Nc) ^a	G38 (Sc)	G38	Boucle après β1
D51 (Sc) ^b	D50 (Nc)	T51	Boucle après β2
K92 (Nc) ^a	P92 (Sc)	R93	Boucle après β5
K112 (Nc) ^a	V111 (Sc)	K113	Fin de β7
R124 (Sc) ^b	R125 (Nc)	G126	β8
T135 (Nc) ^a	T136 (Sc)	S137	Fin de β9
D156 (Nc) ^a	D157 (Sc)	E158	Fin de β10
K205 (Sc) ^b	K206 (Nc)	V206	β14
S211 (Nc) ^a	C211 (Sc)	T211	Fin de β14
K234 (Sc) ^b	K234 (Nc)	K236	β16
R240 (Nc) ^a	D240 (Sc)	N239	Boucle après β16
R248 (Sc) ^b	K248 (Nc)	Q249	β17
R252 (Sc) ^b	R252 (Nc)	K252	Boucle après β17
D264 (Nc) ^a	D265 (Sc)	D264	Fin de β18
K267 (Sc) ^b	K267 (Nc)	N267	Boucle après β18

**Tableau I.3 : Résidus impliqués ou non dans le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal dépendant du voltage** (^a) données issus de (Song *et al.*, 1998), (^b) données issus de (Thomas *et al.*, 1993). (Nc) : *N. crassa* ; (Sc) : *S. cerevisiae*.



**Figure I.21 Structures et états de charges des porines mitochondriales de mammifères vue de l'espace cytosolique.** (A) Représentation des structure hVDAC1 résolue par spectroscopie en RMN (2K4T) (Hiller *et al.*, 2008), la structure de hVDAC1 résolue conjointement par spectroscopie en RMN et cristallographie aux rayons X (2JK4) (Bayrhuber *et al.*, 2008) et la structure mVDAC1 résolue par cristallographie en rayons X (3EMN) (Ujwal *et al.*, 2008). (B) Etats de charges et encombrement stérique modélisés *via* le logiciel PyMOL 1.1 des charges positives et négatives sont respectivement en bleu et rouge (D'après (Summers et Court, 2010)).

Basés sur les données biochimiques et structurales mentionnées ci-dessus plusieurs mécanismes d'ouverture et fermeture du pore *via* l'implication de l'extrémité *N*-terminale ont été envisagés.

***(i) Un mouvement du domaine N-terminal de l'extérieur vers l'intérieur de la lumière du pore***

Il a ainsi été proposé que le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal implique un mouvement du domaine *N*-terminal de l'extérieur vers l'intérieur de sa lumière à l'aide d'une charnière peptidique (à l'image d'un bras plus ou moins articulé). Ce mouvement pourrait s'accompagner du déplacement de feuillets  $\beta$ , adjacents à l'extrémité *N*-terminale, à l'intérieur du canal. Ainsi, si le mécanisme d'ouverture implique un tel mouvement de l'extrémité *N*-terminale, les structures 3D du VDAC récemment obtenues représenteraient différents sous états « fermés » du canal dans lequel le domaine *N*-terminal se localise.

***(ii) Un mouvement du domaine N-terminal structuré en hélice  $\alpha$  dans la lumière du pore***

Un second mécanisme d'ouverture du canal a été suggéré suite à l'obtention des structures 3D du VDAC. Il mettrait en jeu un mouvement moléculaire du domaine *N*-terminal, structuré en hélice  $\alpha$ , dans le pore. Celui-ci serait facilité par une charnière moléculaire composée d'un cluster de résidus glycine (G21-Y22-G23-F24-G2) et par des interactions électrostatiques entre les résidus négativement chargés sur la paroi du tonneau (feuillets  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  et  $\beta_8$ ) et ceux positivement chargés dans le domaine *N*-terminal (Ujwal *et al.*, 2008). Cette séquence charnière est conservée chez les porines de mammifères (pour revue : (Summers et Court, 2010)), mais ne constitue pas une caractéristique absolue du VDAC. Dans l'hypothèse de l'existence de tel mouvement, cette charnière autoriserait un déplacement du domaine *N*-terminal d'environ  $10^\circ$  qui serait suffisant pour obstruer partiellement la lumière du canal, créant ainsi un état « fermé » (Bayrhuber *et al.*, 2008).

***(iii) Une transition conformationnelle du domaine N-terminal par le passage d'une structure en hélice  $\alpha$  en un élément moins structuré***

Le troisième mécanisme possible d'ouverture est suggéré directement à partir des structures 3D du VDAC présentées dans la **Figure I.19**. Supposant que la structure décrite par Hiller représente un état « fermé » et que les deux autres structures illustrent un état « ouvert », il est tentant de proposer que le mécanisme d'ouverture puisse être simplement une transition conformationnelle du domaine *N*-terminal. Il a été montré précédemment dans la littérature que le domaine *N*-terminal peut adopter différentes conformations (De Pinto *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1995). Ainsi, en partant de l'état « ouvert », une différence de potentiel appliquée à la membrane pourrait donc avoir une action sur les régions « senseurs » du pore provoquant en outre une déstabilisation de l'interaction du domaine *N*-terminal avec la paroi du tonneau. Le dépliement de l'hélice et l'établissement d'interactions nouvelles avec d'autres régions « senseurs » du tonneau pourrait alors causer un état « fermé » du pore.

Ce dernier modèle est privilégié pour deux raisons principales : i), des calculs électrostatique de Poisson-Boltzmann et de Poisson-Nernst-Planck soutiennent que la structure publiée du VDAC1 murin représente l'état sélectif aux anions et par conséquent suggèrent que la structure est dans une conformation dite « ouverte » (Choudhary *et al.*, 2010). Les données obtenues sont en accords avec un mécanisme d'ouverture impliquant l'extrémité *N*-terminale. Cependant, les auteurs de ce travail précisent que ce n'est pas aussi simple qu'un mouvement latéral ou horizontal de l'hélice. En effet, ils suggèrent que cette hélice puisse décrire à la fois des mouvements dans différentes directions de l'espace mais aussi subir des réarrangements structuraux. ii), d'autres études proposent l'existence d'une différence de potentiel électrostatique de part et d'autre de la membrane externe. Des variations de ce potentiel induites par des effecteurs biologiques réguleraient alors l'ouverture et la fermeture de la porine (Liu et Colombini, 1992; Lemeshko et Lemeshko, 2000; Lemeshko et Lemeshko, 2004).

### **I.3.2.7 La sélectivité du pore**

En ce qui concerne le transport de métabolites, le VDAC a pendant longtemps été considéré comme un banal filtre moléculaire dont la sélectivité ne se réduisait finalement qu'au diamètre de son pore. Sur ce principe, toutes les molécules ayant un encombrement stérique adapté à la taille du pore pouvaient potentiellement la traverser. Or, cette définition semble aujourd'hui dépassée. En effet de nombreux travaux suggèrent que la porine mitochondriale présente une certaine

sélectivité puisque plusieurs sites de fixations ont été mis en évidence ainsi que plusieurs partenaires protéiques donnant ainsi à cette protéine une dimension beaucoup plus importante en l'impliquant dans de grandes fonctions cellulaires (voies énergétiques, mort cellulaire, *etc.*).

#### I.3.2.7.1 Fixation des nucléotides et dérivés

Il a auparavant été suggéré que la porine VDAC soit régulée par les nucléotides adényliques et leurs dérivés (Florke *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Yehezkel *et al.*, 2006). Chez la porine de *N. crassa*, il a été montré que le NAD(P)H, l'ATP et l'ADP régulent le diamètre du pore et l'existence de sites de fixations de l'ATP (noté NBS pour « *Nucleotides-Binding Sites* ») a été proposée (Rostovtseva et Colombini, 1997; Rostovtseva et Bezrukov, 1998; Rostovtseva *et al.*, 2002a; Rostovtseva *et al.*, 2002b). La présence de NBS au sein de porines VDAC animales a été montrée par sa fixation sur colonne d'ATP agarose (Florke *et al.*, 1994). De plus, des expériences de fixation d'ATP radiomarqués au phosphore 32 (noté [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP) ont montré une interaction (Florke *et al.*, 1994). Plus récemment, Yehezkel et ses collaborateurs ont mis en évidence à l'aide d'un analogue d'ATP photoactivable (le benzoyl-benzoyl-ATP noté [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-BzATP), des sites de fixations de l'ATP de basse et de haute affinité pour la porine mVDAC1 (Yehezkel *et al.*, 2006). L'analyse en MALDI-ToF-MS de la porine marquée au [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-BzATP confirme la fixation deux molécules de BzATP par molécule de porine. Les sites se localisent dans les régions C-terminale (271-283) et N-terminale (19-25) de la porine (Yehezkel *et al.*, 2006). Des travaux de mutagenèse dirigée ont complété ces résultats et montrent l'importance de la lysine 20 dans la liaison du mVDAC1 à l'ATP (Yehezkel *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données est reporté sur les modèles illustrés dans la **Figure I.20**.

#### I.3.2.7.2 Fixation des ions $\text{Ca}^{2+}$

Au même titre que l'ATP, le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle majeur dans la cellule et réalise le lien entre la mitochondrie et le cytosol, on parle de « *cross-talk* ». En effet, le calcium est avant tout un messenger intracellulaire dans la transduction de signal (Berridge *et al.*, 1998 ; Mooren et Kinne, 1998 ; Crompton, 1999). Cette concentration intramitochondriale en  $\text{Ca}^{2+}$  module les enzymes critiques du cycle de Krebs, de l'oxydation des acides gras, du catabolisme des acides aminés, l'ATP synthase et l'Ancp. Dans les mitochondries d'origine animale, les concentrations matricielles élevées d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (au dessus de 1 à 3  $\mu\text{M}$ ) induisent une augmentation de la perméabilité de la membrane interne des mitochondries causée par l'ouverture d'un pore non

spécifique (« *Permeability Transition Pore* » ou PTP) (Crompton, 1999 ; Pozzan et al., 2000). Il a été montré que le hVDAC1 est perméable aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et possède des sites de fixation qui contrôlent son activité (Shoshan-Barmatz et al., 2003). Ces derniers ont pu être identifiés *via* l'utilisation d'un réactif photoactivable, l'azido ruthenium (AzRu), capable d'interagir spécifiquement avec des protéines fixant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  en inhibant fortement leur activité. L'analyse en MALDI-ToF-MS de la porine mVDAC1 marqué au réactif AzRu révèle la présence de deux sites de fixations au  $\text{Ca}^{2+}$  qui correspondent aux résidus E72 et E202 (Israelson *et al.*, 2007).

### I.3.2.7.3 Les partenaires protéiques présumés de la porine

Le **Tableau I.4** résume les principaux partenaires protéiques susceptibles d'interagir avec la porine hVDAC1 et impliquant cette dernière dans différentes fonctions cellulaires. Il s'agit principalement de l'Hexokinase (Nakashima *et al.*, 1986), de l'Ancp (Marzo *et al.*, 1998), de la MtCK (Schlattner *et al.*, 2001) et des protéines pré-apoptotiques appartenant à la famille de Bcl2 (Tsujimoto et Shimizu, 2000). Les zones d'interaction caractérisées ou présumées sont présentées dans le **Tableau I.4**.

### I.3.2.8 Organisation supramoléculaire de la porine dans la membrane

L'état oligomérique de la porine est également matière à débat. En effet, bien que certaines études concluent à l'existence d'un VDAC fonctionnel en tant que monomère tel qu'il a été récemment cristallisé (Ujwal et al., 2008), d'autres indiquent que les porines de rat et humaine dans la membrane correspondent à des structures dimérique, trimérique, tétramérique et hexamérique (Mannella, 1982; Linden et Gellerfors, 1983; Shi *et al.*, 2003; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2004; Zalk *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2007; Hoogenboom *et al.*, 2007). Cependant, les raisons de ce mécanisme d'oligomérisation de la porine ne sont pas évidentes sachant que le canal par lequel transitent les métabolites est celui qui se trouve au centre du tonneau et que la formation d'oligomères n'est donc pas *a priori* nécessaire pour le fonctionnement du pore. Il a donc été proposé que l'organisation supramoléculaire de la porine n'est qu'un rôle dans la stabilisation de la protéine, de même que pour les porines bactériennes (Cowan *et al.*, 1992). Une publication récente décrit la porine mVDAC1 dans un état dimérique orienté tête bêche

Partenaires protéiques	Domaines d'interactions des partenaires	Médiateurs		Domaines d'interactions de hVDAC1		Rôles	Fonctions	Références bibliographiques
		Positif (+)	Négatif (-)					
Hexokinase I et II (HK I et HK II)	Extrémité N-terminale hydrophobe en hélice $\alpha$ (MIASHLLAYFFTE LM)	Mg ²⁺ , Résidus E188 et E202 du VDAC	Glucose-6-phosphate (G6P) et DCCD	Résidu	Localisation dans la structure	PTP	Apoptose mitochondriale	(Nakashima <i>et al.</i> , 1986; Al Jamal, 2005; Zaid <i>et al.</i> , 2005)
				E72	Feuillet $\beta$ 4			
				E65	Boucle cytosolique n°2			
				D77	Boucle matricielle n°2			(Abu-Hamad <i>et al.</i> , 2008)
				K73	Feuillet $\beta$ 4			
Ancp	?							(Marzo <i>et al.</i> , 1998) (Beutner <i>et al.</i> , 1998; Halestrap et Brenner, 2003)
MtCK	Induite par les cardiolipides (?)							(Brdiczka <i>et al.</i> , 1994) (Stachowiak <i>et al.</i> , 1998) (Wallimann <i>et al.</i> , 1992) (Schlattner <i>et al.</i> , 2001)
Les protéines de la famille Bcl2	Hélices transmembranaires H5 et H6	?		?		PTP	Apoptose mitochondriale	(Tsujimoto et Shimizu, 2000) (Azoulay-Zohar <i>et al.</i> , 2004; Malia et Wagner, 2007) (Pastorino et Hoek, 2003)

**Tableau I.4 : Les différents partenaires présumés du VDAC (D'après les données de la littérature).**

(Ujwal *et al.*, 2009). L'arrangement en hexamère des dimères de porine orientés tête bêche au sein des cristaux pourrait mimer en fin de compte celui natif observé dans des études de diffraction électronique (Mannella, 1982) et plus récemment d'AFM sur des membranes externes mitochondriales (Hoogenboom *et al.*, 2007).

### **I.3.2.9 Rôle des stérols dans l'activité de la porine**

Dans la membrane externe mitochondriale, les stérols sont présents en très grande quantité puisqu'un total de cinq molécules de cholestérol par monomère de porine a été dénombré dans les mitochondries de coeur de boeuf (De Pinto *et al.*, 1989). Dans le cas de *N. crassa* (Freitag *et al.*, 1982a; Freitag *et al.*, 1982b) et de *S. cerevisiae* (Le Saux *et al.*, 1996), de grandes quantités d'ergostérol ont été détectées dans des préparations de porine. La présence de stérols associés au bon fonctionnement du VDAC a été montrée *in vitro* (Popp *et al.*, 1995). Ainsi, les porines de *Dictyostelium discoideum*, de *Paramecium* et de rat, une fois délipidées, sont incapables de former des canaux fonctionnels dans des membranes artificielles. Cependant, une simple pré-incubation de ces protéines en présence de stérols et de détergent leur permet de regagner la capacité de transporter. Cela suggère que des stérols sont indispensables au bon fonctionnement de la porine dans la membrane externe mitochondriale. Ce résultat est cependant à considérer avec prudence puisque, dans le cas des Ancp de mammifères reconstitués en liposomes, l'activité d'échange des nucléotides est stimulée en présence de cholestérol alors que ce même stérol est absent des membranes internes mitochondriales (Kramer, 1982). Il est possible que l'effet des stérols sur le fonctionnement de ces deux protéines soit indirect, causé par le changement de composition et donc d'état physique de la membrane artificielle utilisée pour la reconstitution, et non à une interaction spécifique *in vivo* entre les stérols et la protéine membranaire d'intérêt.

## **I.4 Etude de l'accessibilité au solvant de protéines membranaires par échange H/D couplé à une analyse en spectrométrie de masse**

La compréhension poussée des mécanismes moléculaires du vivant fait appel à un grand nombre de techniques plus ou moins faciles à mettre en œuvre. Nombreuses sont celles qui ont été utilisées dans l'étude du mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP, allant des plus simples comme le SDS-PAGE à d'autres, beaucoup plus difficile en mettre en œuvre, comme la diffraction des rayons X et plus récemment l'échange H/D couplé à une analyse en spectrométrie de masse (HDX-MS)(Rey *et al.*, 2010a). Afin de comprendre toujours mieux les phénomènes



biologiques, le développement de nouvelles techniques est nécessaire et fournit de nouveaux moyens d'études.

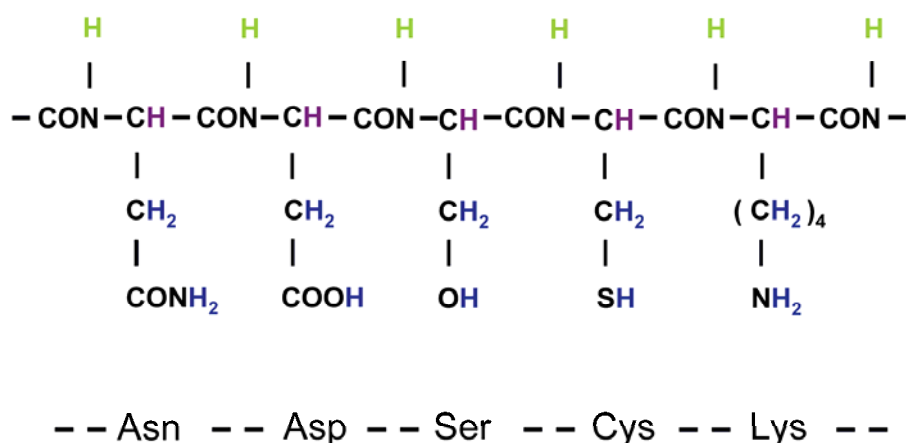
#### **I.4.1 Généralités sur l'échange H/D.**

Différentes techniques, utilisées depuis plusieurs décennies dans le cadre d'études biophysiques de protéines, font appel à un marquage réversible des protéines par des atomes de deutérium. C'est le cas de la spectrométrie infrarouge, ou de la spectroscopie en RMN (Dyson et Wright, 2004). Son utilisation en spectrométrie de masse (SM) est quant à elle beaucoup plus récente. En effet, les premières applications d'un marquage de protéines par échange hydrogène/deutérium couplé à une analyse en spectrométrie de masse (HDX-MS) sont apparues immédiatement après la mise au point de la source electrospray dans le cadre de l'étude des molécules biologiques, et datent du début des années 90 (Chowdhury *et al.*, 1990; Katta et Chait, 1991; Zhang et Smith, 1993). Depuis, le développement de cette méthode est en constante progression. Ainsi, l'HDX-MS est en train de devenir un outil de plus en plus performant pour étudier la dynamique conformationnelle des protéines, leur repliement ou leurs interactions avec des partenaires, protéiques ou non. Cette méthode est basée sur la labilité des hydrogènes des liaisons peptidiques qui vont pouvoir être remplacés par des deutériums après dilution de la protéine dans un milieu deutéré (comme le D₂O). Ce marquage non invasif, ne déstructurant pas les protéines, peut donc être utilisé pour mettre en évidence des changements de conformation. La vitesse d'incorporation des deutériums, ainsi que leurs localisations dans la protéine, peuvent être suivies en analysant avec précision la masse des différents peptides issus de la protéolyse de la protéine d'intérêt (pour revue (Wales et Engen, 2006)). La comparaison des vitesses d'échange d'une zone protéique dans des conditions différentes rend compte d'une augmentation ou diminution de l'exposition au solvant de la zone observée et renseigne sur les changements conformationnels de la protéine (pour revue : (Wales et Engen, 2006)). Développé pour l'étude des protéines solubles, son champ d'action s'est depuis étendu à l'analyse des protéines membranaire.

#### **I.4.2 Le principe de l'échange hydrogène/deutérium**

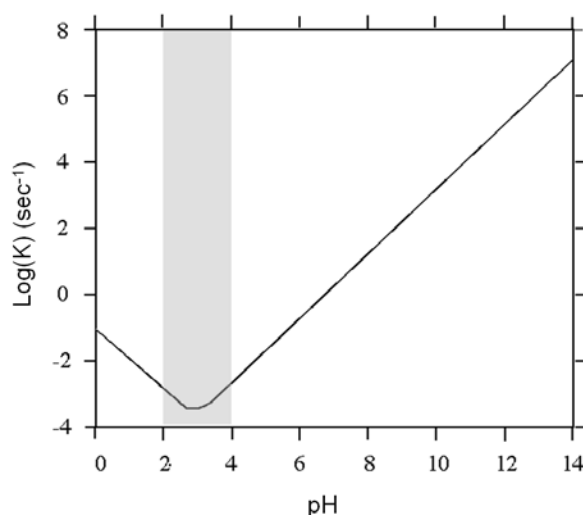
Les hydrogènes portés par les protéines peuvent être regroupés en trois grandes classes, en fonction de leur vitesse relative d'échange : ceux qui ne s'échangent pas, ceux qui s'échangent trop vite et ceux dont la vitesse est comprise entre quelques secondes et plusieurs mois. Les premiers, portés par les carbones des acides aminés, ne s'échangent pas et ne peuvent donc pas

être concernés par cette technique (**Figure I.22**). Les seconds sont les hydrogènes portés par les hétéroatomes des chaînes latérales des acides aminés. Leur échange est extrêmement rapide et le marquage ne pourra pas être conservé durant la phase d'analyse. Les seuls hydrogènes ayant une vitesse d'échange compatible avec la technique sont ceux portés par les liaisons peptidiques. Leur vitesse d'échange est extrêmement variable et dépend de nombreux paramètres, comme le pH (Bai *et al.*, 1993), la température (Zhang et Smith, 1993) la nature de la séquence primaire (Bai *et al.*, 1993), l'implication de l'hydrogène dans une liaison H (Hilser et Freire, 1996), l'accessibilité de la zone au solvant (pour revue : (Wales et Engen, 2006)).



**Figure I.22 : Identifications des différents hydrogènes présents dans la structure primaire d'une chaîne polypeptidique quelconque capables ou non de s'échanger avec le solvant ( $\text{D}_2\text{O}$ ).** En vert sont colorés les hydrogènes des liaisons amidiques qui s'échangent avec le solvant, en violet, les hydrogènes des chaînes aliphatiques et en bleu ceux des chaînes latérales des acides aminés. Dessous est indiquée (par un code à trois lettres) la séquence de la chaîne polypeptidique prise pour exemple : asparagine (Asn), aspartate (Asp), Serine (Ser), Cystéine (Cys) et Lysine (Lys).

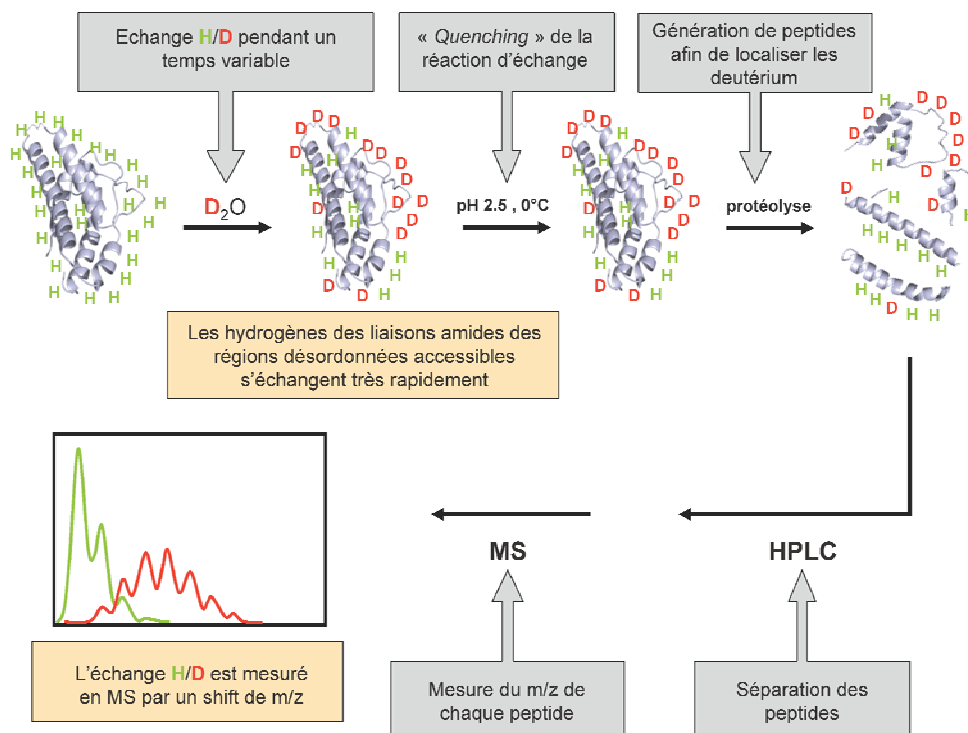
Parmi tous les paramètres influençant la vitesse d'échange, un intérêt tout particulier est porté au pH et à la température. En effet, il a été montré que la vitesse d'échange des hydrogènes des liaisons peptidiques d'une chaîne de poly-alanine variait d'un facteur dix pour chaque unité de pH (**Figure I.23**) et d'un facteur trois tous les dix degrés Celsius (Bai *et al.*, 1993). Pour ces raisons, le marquage, une fois réalisé dans les conditions adéquates au maintien de la structure de la protéine étudiée, sera arrêté en amenant le pH entre 2 et 4 et en congelant l'échantillon dans l'azote liquide jusqu'à son analyse en SM.



**Figure I.23 : Influence du pH sur la constante d'échange H/D d'une chaîne de poly-alanine.** Vitesse d'échange d'une chaîne de Poly-L-Alanine à 5°C dans 0,5 M KCl. La zone de moindre échange est comprise entre pH=2,5 et 3 (Bai *et al.*, 1993).

#### I.4.3 Marquage en continu des protéines au deutérium

Le marquage des protéines par du deutérium est un processus assez simple. En effet, la méthode la plus courante est la dilution d'une solution de protéine protonée dans un milieu deutéré (**Figure I.24**). Typiquement, une dilution de 15 à 20 fois de la solution de protéine dans le milieu deutéré permet d'obtenir un milieu réactionnel contenant plus de 90 % D₂O permettant de favoriser la réaction d'échange d'un deutérium pour un hydrogène. Une fois la dilution réalisée, des aliquotes vont être prélevées à différents intervalles de temps et la réaction de marquage par échange arrêtée en abaissant le pH au point d'échange le plus lent et en congelant l'échantillon. Pour chaque atome de deutérium incorporé, la masse de la protéine augment d'un Da. De cette manière, la cinétique d'incorporation du deutérium peut être suivie en mesurant la masse des protéines ou des peptides à différents temps. La vitesse d'échange isotopique des hydrogènes amidiques d'un peptide dépend principalement de son implication dans des liaisons hydrogènes (Hilser et Freire, 1996), son exposition vis-à-vis du solvant (à l'intérieur ou extérieur de la protéine) (Resing et Ahn, 1999), la flexibilité de la région à laquelle il appartient. En résumé la vitesse d'échange isotopique d'un atome d'hydrogène dépend de son accessibilité au solvant ainsi que de sa participation dans la stabilisation de structures secondaires. Autrement dit, des protons amidiques de structure secondaire en hélice  $\alpha$  ou feuillet  $\beta$  ou enfouis au cœur de la protéine auront des taux d'échange beaucoup plus faibles que ceux situés dans des boucles exposées à la surface de la protéine.



**Figure I.24 : Principe de l'échange Hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) pour la méthode de marquage en continu des protéines.** Le marquage continu consiste à incubuer une protéine dans du  $D_2O$ . Certains hydrogènes labiles des liaisons amides vont pouvoir s'échanger par des deutériums, un marquage qui témoigne de la structure et la conformation de la protéine est ainsi obtenu. L'étape suivante est celle du « *quenching* » qui consiste à bloquer les échanges isotopiques en abaissant le pH et la température afin de limiter le contre échange. Puis la protéine est digérée par une protéase qui conserve son activité dans les conditions décrites précédemment. Les peptides obtenus sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse (HPLC) et analysés en ligne par spectrométrie de masse (MS). La comparaison de la masse des peptides pour la protéine non deutérée (en vert) avec la masse de ceux issus de la protéine deutérée (en rouge), permettra de déterminer un taux de deutération pour chacun des peptides.

#### I.4.4 Le problème du ré-échange du deutérium

Comme la deutération est réalisée par échange, une perte d'informations liée au contre-échange des deutériums par des hydrogènes présents dans les solvants utilisés pour l'analyse peut avoir lieu. Afin de minimiser au maximum cette perte, les étapes suivantes de l'analyse doivent être aussi rapides que possible et doivent se dérouler aux conditions de pH et de température les plus défavorables à l'échange des protons, c'est-à-dire en milieu acide (pH 2,5-4) et à basse température ( $0^\circ C$ ). Dans de bonnes conditions, le contre-échange cause une perte de 1 à 3 % de l'information lors de l'analyse de la protéine entière, et de 10 à 20 % si on réalise une protéolyse puis une séparation par HPLC des peptides libérés. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour essayer de corriger la perte d'information. L'une d'entre elles suggère de comparer la deutération d'un peptide à la deutération maximale du même peptide, toutes deux obtenues dans

des conditions similaires d'analyse (Zhang et Smith, 1993). Ceci est possible à deux conditions. D'une part, il faut obtenir une protéine entièrement deutérée, et d'autre part il faut que la perte de deutération ne soit pas influencée par la quantité de deutérium incorporé. Dans ces conditions on peut appliquer l'équation 2 et obtenir le taux de deutération corrigé du contre-échange.

$$D = 100 \times \frac{M - M_H}{M_D - M_H}$$

**Equation de correction du contre-échange (Zhang et Smith, 1993)** D représente le taux de deutérium incorporé une fois corrigé (en %);  $M$ , la masse moyenne observée,  $M_H$  la masse moyenne hydrogénée,  $M_D$  la masse moyenne totalement deutérée observée.

L'obtention d'une protéine totalement deutérée est un point fondamental de la correction. Mais toutes les protéines ne supportent pas les méthodes employées pour réaliser une deutération poussée et complète sur toute la séquence. Ces méthodes consistent par exemple à effectuer des cycles de dilution/concentration dans un tampon deutéré en présence d'agents dénaturants, ou à lyophiliser plusieurs fois la protéine après resuspension dans un milieu deutéré. De plus, et même si la protéine supporte la dénaturation ou la lyophilisation, il est très difficile d'être sûr que 100 % des liaisons soient deutérées (pour revue : (Wales et Engen, 2006)). Dans le cas des protéines membranaires, cette étape s'est avérée impossible.

Cependant, l'utilisation de données corrigées n'est importante que si l'on souhaite obtenir le nombre exact de deutériums incorporés. Dans notre cas, l'étude est menée en comparant l'accessibilité d'une même zone (même séquence) dans différentes conditions (en présence de différents inhibiteurs). Dans ce protocole, la correction du contre-échange n'est pas nécessaire, puisqu'elle affecte de la même manière la même séquence dans les différentes conditions (pour revue : (Wales et Engen, 2006)).

#### I.4.5 L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine marquée au deutérium

Une fois le deutérium incorporé dans la protéine repliée, celle-ci doit être analysée par SM afin de pouvoir mesurer le plus précisément possible le gain de masse induit par l'addition de deutériums. L'analyse peut être conduite dans deux optiques différentes selon le but recherché, à savoir rapide et globale, ou plus longue et plus précise. La première technique permet une mise en évidence de la différence globale d'accessibilité des liaisons amides de la protéine et rend

compte de l'exposition moyenne de la protéine au solvant. En effet, plus la surface en interaction avec le milieu extérieur est importante, plus la protéine est globalement deutérée. Cette méthode permet en outre un criblage rapide des partenaires interagissant avec une protéine donnée, pour peu que ceux-ci influent suffisamment sur la structure de cette protéine. Cette technique n'a pas été abordée dans notre étude des transporteurs mitochondriaux et de la porine. L'autre méthode est beaucoup plus précise, et peut pour certaines zones de la protéine apporter des informations fines quand à l'accessibilité d'une liaison amide au solvant.

#### I.4.6 Digestion de la protéine deutérée par des protéases acides

Pour atteindre la meilleure résolution spatiale possible, la protéine, une fois deutérée, va devoir être clivée en un maximum de peptides courts (5-10 acides aminés) et chevauchants (**Figure I.24**) (Zhang et Smith, 1993). Des peptides présentant une extrémité commune vont permettre d'affiner l'analyse de la deutération en retranchant la masse deutérée d'un petit peptide à celle d'un plus grand (Garcia *et al.*, 2004). Du fait des risques de contre-échange lors de l'étape de digestion, celle-ci doit être la plus courte possible et s'effectuer en milieu acide (**Figure I.24**). Généralement, une protéolyse par la pepsine de 1 à 2 min à 0°C donne de bons résultats, mais il existe néanmoins plusieurs problèmes à résoudre. En effet, l'utilisation de protéases acides imposée par les conditions d'échange minimum génère des fragments peptidiques imprévisibles du fait de la non-spécificité des protéases de ce type. Ceci ajoute donc une étape d'identification des produits de protéolyse, préalable à l'analyse du taux de deutération des peptides, étape qui est classiquement réalisée à l'aide des techniques de SM en tandem (**Figure I.24**). Néanmoins, et pour des conditions expérimentales rigoureusement fixées (milieu, concentration en protéine et en protéases), la protéolyse s'opère en général de manière très reproductible. De plus, et c'est tout particulièrement vrai pour de grosses protéines (>30-40 kDa), l'utilisation de la pepsine peut générer des peptides de plus de 15 acides aminés de longueur ou laisser une ou plusieurs parties de la protéine intactes, altérant alors la précision des informations obtenues. Pour augmenter le nombre de peptides différents générés et donc la précision des données collectées, plusieurs améliorations ont été apportées à l'étape de protéolyse. Premièrement, une palette de protéases « acides » utilisées en association ou séparément permet d'améliorer la résolution en produisant de nouveaux peptides chevauchants, plus courts ou issus d'une région laissée intacte par la pepsine (Cravello *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Rey *et al.*, 2009). Deuxièmement l'emploi d'agents chaotropiques ou réducteurs durant l'étape de protéolyse ainsi que l'utilisation de protéases couplées à une phase solide permet de fournir de nouvelles conditions de protéolyse

susceptibles d'améliorer la résolution spatiale de la méthode (Zhang *et al.*, 2001; Burke *et al.*, 2008; Rey *et al.*, 2009).

#### **I.4.7 Analyse des produits de digestion à l'échelle peptidique**

Une fois la protéine deutérée et les différents peptides générés par la protéolyse, il faut séparer les peptides afin de pouvoir en analyser le plus grand nombre. Cette séparation s'effectue le plus souvent par une chromatographie liquide en phase inverse (LC) après concentration de l'échantillon sur un piège (petite colonne hydrophobe) et dessalage (**Figure I.24**). Enfin, après les avoir séparés selon leur degré d'hydrophobicité, les différents peptides sont analysés, à l'aide soit d'une source ESI (ce travail) soit d'une source MALDI. Finalement, le contenu en deutériums de chaque peptide est calculé en mesurant la masse moyenne du massif isotopique obtenu.

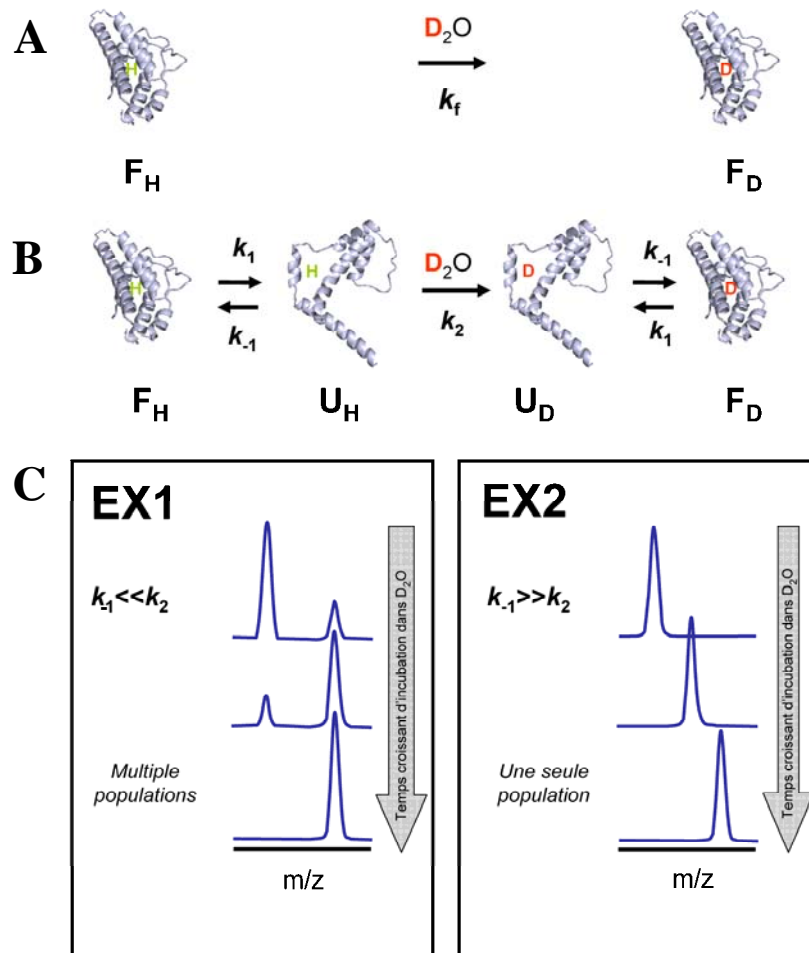
#### **I.4.8 Analyse fines des zones deutérées à l'échelle de l'acide aminé**

La localisation des deutériums sur les peptides d'intérêt est assez peu précise. Cependant, de nouvelles méthodes d'analyse permettent maintenant de fragmenter les ions obtenus et de mesurer la masse des ions « fils ». Ces techniques de fragmentation permettent d'obtenir des informations locales, au niveau de chaque acide aminé, et accroissent encore la précision des informations obtenues. Parmi les méthodes actuellement utilisées, on trouve par exemple les techniques de fragmentation par collision (Collision Induced Dissociation ou CID) ou de dissociation par capture électronique (Electron Capture Dissociation ou ECD). Récemment il a été mis en évidence que les hydrogènes d'un peptide étaient capables de se déplacer de proche en proche avant leur fragmentation. Ce mouvement dépend de nombreux facteurs et conduit à une moyenne du contenu en deutérium du peptide, rendant les données récoltées erronées (Demmers *et al.*, 2002; Hoerner *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005). Cependant la méthode ECD étant suffisamment rapide, il est possible de trouver des conditions d'analyse où la fragmentation est plus rapide que le déplacement des hydrogènes en phase gazeuse, rendant cette méthode applicable (Pan *et al.*, 2008).

#### I.4.9 Les différentes cinétiques d'échange H/D

Il existe plusieurs modèles cinétiques pour décrire les échanges H/D dans une protéine native. Deux composantes sont intégrées dans ces modèles: le facteur structural associé à la protéine repliée (noté  $\beta$ ) et le facteur chimique ( $k_2$ ) qui représentera la vitesse d'échange des protons totalement exposés dans des zones non structurées. Ainsi, la deutération d'une zone peut être rendue possible par simple pénétration du solvant (**Figure I.25A**) soit par des phénomènes localisés de dépliement/repliement de la protéines (**Figure I.25B**) (Woodward et al., 1982) (Englander et Kallenbach, 1984) (Miller et Dill, 1995). La deutération d'une population de molécule suit de façon générale une cinétique d'échange de type EX2 illustrée dans la **Figure I.25C** qui est caractérisée par la présence d'une seule et unique enveloppe qui progresse au cours du temps sur l'échelle des m/z. Considérant le modèle présenté dans la **Figure I.25B**, ce type de comportement cinétique suggère que les phénomènes de dépliement/repliement de la protéine soient beaucoup plus rapides que ceux liés à la diffusion du deutérium dans la protéine. L'HDX-MS peut être utilisé pour distinguer différentes populations de molécules qui peuvent coexister pendant la réaction d'échange H/D, par exemple, pour une protéine, des états conformationnels distincts les uns des autres qui se deutèrent différemment (Miranker, 1993 ; Engen, 2000 et Arrington, 1999). Les spectres de masse résultant sont très spécifiques et sont caractérisés par la présence de plusieurs enveloppes sur l'échelle des m/z, au minimum deux. (Cependant, plusieurs populations peuvent coexister au sein d'une même enveloppe). On parle de cinétiques d'échange de type EX1 (**Figure I.25C**) qui se manifeste au niveau analytique par la disparition d'une des deux enveloppes associée à une population de conformère qui se deutère plus rapidement au profit de la seconde enveloppe associée à l'autre population de conformère qui suit par ailleurs une deutération classique de type EX2. Ce type de comportement cinétique suggère que la vitesse de passage d'une population conformationnelle à une autre soit inférieure à celle de diffusion des deutériums.





**Figure I.25 : Différents modèles d'échange d'hydrogènes** (A) dans une protéine repliée (B) dans une protéine dépliée. Les constantes cinétiques de dépliement et repliement sont notées  $k_1$  et  $k_{-1}$  respectivement.  $k_2$  est la constante d'échange pour un peptide déplié, une valeur qui peut être calculée (Bai *et al.*, 1993). (C) Les deux types de cinétiques EX1 et EX2. La protéine repliée est notée F pour « *Folded* » alors que la protéine dépliée est notée U pour « *Unfolded* », l'indice H et D signifient respectivement « *Hydrogenated* » et « *Deuterated* ». La constante d'échange  $k_f$  concerne la protéine repliée, elle est définie par l'équation suivante :  $k_f = \beta k_2$  où  $\beta$  (compris entre 0 et 1) est fonction de plusieurs paramètres incluant l'accessibilité au solvant et l'implication des protons échangeables dans des liaisons hydrogènes. Extrait de pour revue (Wales et Engen, 2006) et (Weis *et al.*, 2006).

#### I.4.10 Les protéines membranaires en spectrométrie de masse

La technique d' HDX-MS a permis l'étude de nombreuses protéines solubles depuis sa première application en 1991 (Katta et Chait, 1991). Cependant, peu de protéines membranaires ont été étudiées par cette approche, et aucune en conditions natives (Joh *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009). En effet, l'étude de ces protéines par SM est beaucoup plus compliquée que celle des protéines solubles pour de nombreuses raisons. La première d'entre elles provient de l'emploi de fortes concentrations de détergent lors de l'extraction et de la purification des protéines de ce type, ce qui induit d'importants problèmes d'analyse. Cela est d'abord dû au rapport entre les concentrations de la protéine d'intérêt et des molécules contaminantes, qui est inhérent à la méthode de solubilisation de ces protéines. En effet, une préparation de protéine membranaire contient environ 100 à 10000 fois plus de molécules de détergent que de protéines. De plus, la présence de lipides et de petites molécules hydrophobes dans les micelles de détergent augmente encore le nombre de molécules contaminantes qui vont altérer, par leur quantité élevée, la qualité des informations obtenues lors de l'analyse même si la préparation ne contient qu'une seule protéine. De plus, les détergents en forte concentration, utilisés lors de l'extraction des protéines des membranes, vont altérer l'ionisation des particules au niveau de la source du spectromètre de masse, que celle-ci soit du type MALDI ou ESI. Dans le premier cas, ils vont interférer avec la formation des cristaux de matrice et donc avec le transfert d'énergie du LASER à la matrice puis à l'échantillon (Brinkworth et Bourne, 2007). Dans le cas d'une source ESI, et par leur nature amphiphile, les détergents vont exposer leur queue hydrophobe à l'air et leur tête hydrophile au solvant au niveau du cône de Taylor, ce qui va altérer à la fois sa stabilité, sa formation, le passage en phase gazeuse des molécules et l'ionisation des particules. De plus les détergents sont des molécules très facilement ionisables, ce qui accroît leur détection lors de l'analyse et masque potentiellement des informations. Pour toutes ces raisons, il est préférable de retirer le détergent de la préparation avant l'analyse pour pouvoir étudier ces protéines par MS.

Afin de réduire la quantité de détergent présents dans l'échantillon, différentes techniques, comme la dialyse, la filtration sur gel, l'absorption sur des billes de polystyrène ou encore l'emploi de cyclodextrine peuvent être mises en œuvre. Ces méthodes qui s'appliquent à une solution de protéines membranaires ne permettent cependant pas de réduire la concentration en détergent au dessous de la CMC (concentration micellaire critique) sans risquer d'entraîner la précipitation de la protéine. De plus, la présence de détergents, même à la CMC, est souvent délétère pour l'analyse en MS et explique que ces approches restent plus préférentiellement employées en biochimie. D'autres voies ont donc été explorées. Une des techniques utilisées

pour supprimer le détergent de la préparation de protéines membranaires a été de précipiter les protéines, le détergent et les lipides à l'aide de solvants ou d'acides, puis d'extraire sélectivement ces deux derniers à l'aide d'autres solvants organiques (Whitelegge *et al.*, 1999; le Coutre *et al.*, 2000; Trimpin et Brizzard, 2009). D'autres approches se sont tournées vers l'emploi de nouveaux détergents. Ainsi, des détergents sensibles aux milieux acides, les ALS (« *Acid-Labile Surfactants* »), ont été employés avec succès dans plusieurs études (Yu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008). Ces détergents ont la propriété de se couper en deux en milieu acide, séparant les parties hydrophiles et hydrophobes. Après protéolyse, le détergent peut être hydrolysé en milieu acide. La partie hydrophobe, insoluble dans l'eau, peut alors être éliminée par centrifugation alors que la partie hydrophile, qui n'interfère pas avec l'analyse, reste en solution. Cependant, des études ont montré que des peptides hydrophobes peuvent être perdus lors de cette étape, entraînant une forte réduction de la couverture peptidique obtenue (Yu *et al.*, 2004). D'autres études ont été réalisées après solubilisation des protéines membranaires à l'aide de solvants organiques (Barnidge *et al.*, 1999; Blonder *et al.*, 2002). Cette approche a permis de s'affranchir de l'emploi de détergent pour solubiliser les protéines et les analyser par SM. Enfin, diverses autres méthodes ont été mises au point pour séparer les détergents, non pas d'une solution de protéines membranaires, mais d'un mélange de peptides issus de leur protéolyse. Ces méthodes sont basées sur les différences de charge ou d'hydrophobicité des peptides vis-à-vis des détergents ioniques ou non. Ainsi, l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions peut être employée pour retenir spécifiquement les peptides d'une solution contenant des détergents non-ioniques ou, à l'inverse, retenir plus fortement les détergents ioniques que les peptides présents (Vissers *et al.*, 1996). Pour tirer parti des différences d'hydrophobicité, l'emploi de colonnes HILIC permet de séparer efficacement les peptides d'un détergent non ionique, mais ne permet pas une aussi bonne séparation des peptides qu'une chromatographie en phase inverse.

Le deuxième problème lié à l'étude des protéines membranaires est leur résistance à la protéolyse enzymatique. En effet, les grandes parties hydrophobes de ces protéines se trouvent isolées de l'eau et donc des protéases par les membranes ou les micelles de détergents et de lipides. De ce fait, il est souvent nécessaire de combiner une protéolyse enzymatique puis chimique, ou inversement, ainsi qu'une séparation des peptides par chromatographie d'exclusion afin d'obtenir une couverture peptidique importante de la protéine d'intérêt. Ainsi, la bactériorhodopsine, une protéine présente dans les membranes de certains microorganismes (comme *Halobacterium salinarum*), est très difficile à protéolysier, et des protocoles particuliers ont été développés pour obtenir des peptides recouvrant toute la séquence de la protéine (Yu *et al.*, 2004).

Malheureusement tous les protocoles proposés dans le cadre de ces études, que ce soit pour éliminer le détergent au niveau protéique ou peptidique, ou pour améliorer la protéolyse des protéines membranaires, ne sont pas applicables à la technique d'HDX-MS par leur complexité et les conditions dans lesquelles ont été effectuées les préparations de protéines. Récemment, une étude par HDX-MS de l'apomyoglobine de cachalot (une petite protéine modèle de la famille des globines), produite de manière recombinante a été réalisée. Elle a permis d'étudier les régions de la protéine qui interagissent, en fonction des conditions de pH, avec des liposomes qui miment les membranes biologiques. Dans cette étude, les lipides ont été séparés des peptides par LC en phase inverse et n'ont pas perturbé l'analyse par SM (Man *et al.*, 2007). De la même manière plusieurs autres protéines interagissant avec des lipides ont pu être étudiées par HDX-MS. C'est le cas par exemple de la phospholipase A₂ dont les zones de fixation à la bicouche lipidique et ses interactions avec divers composés ont pu être étudiées (Burke *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2009). Une étude de protéines membranaires par SM dans des états natifs a récemment été réalisée par l'équipe de Carol Robinson. Celle-ci a permis d'étudier les états oligomériques de différents transporteurs membranaires en s'affranchissant du détergent par l'optimisation des réglages du spectromètre de masse (Barrera *et al.*, 2009). Ces résultats ont été obtenus en utilisant du  $\beta$ -D-dodécyl-maltoside et du  $\beta$ -D-décyl-maltoside à des concentrations proches de la CMC. Plus récemment, une technique d'élimination du détergents, principalement des POE (Polyoxyéthylène), compatible avec les conditions d'analyse utilisées en HDX-MS de peptides deutérés a été mise au point dans notre laboratoire en collaboration avec Eric Forest (Rey *et al.*, 2010b). Ce procédé mettant en jeu un solvant organique, le dichlorométhane, a fait ses preuves dans l'étude de la dynamique conformationnelle du transporteur bAnc1p en HDX-MS (Rey *et al.*, 2010a).

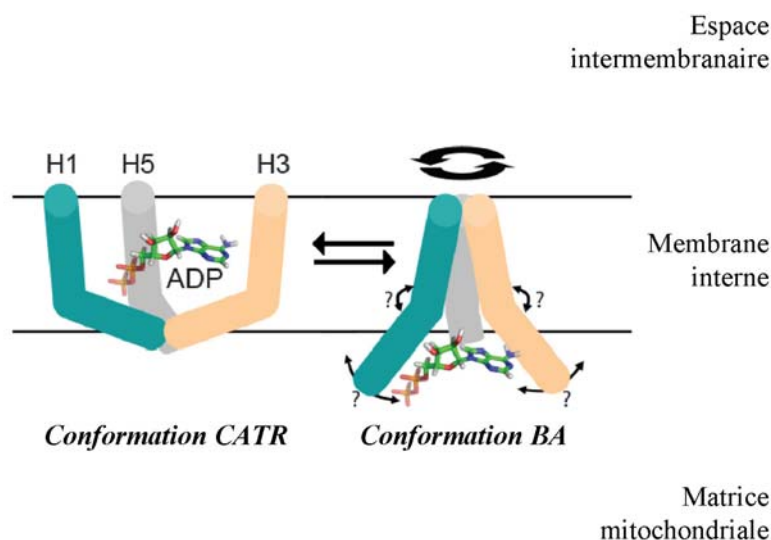
## I.5 Problématique, objectifs et organisation du projet

Alors que les séquençages de génomes indiquent que la part des protéines membranaires peut représenter entre 20 et 30% des protéines totales de la cellule (Wallin et von Heijne, 1998), à l'heure actuelle les structures à haute résolution de cette famille de protéines accusent un retard considérable. En effet, on ne connaît la structure que de moins de 1% des protéines membranaires en comparaison des protéines solubles. Les difficultés rencontrées sont multiples et inhérentes à leur étude. En effet, leurs caractérisations nécessitent dans un premier temps leurs expressions qui, à la grande différence des protéines solubles, peut s'avérer *in vivo* limité par leur

important dans la membrane. De plus, ces études structurales requièrent une grande quantité de protéines. Enfin, leurs extractions des membranes et leurs isolements nécessitent l'utilisation de détergents afin d'une part de respecter leur propriété hydrophobicité et d'autre part de conserver leur état natif. Même s'il est possible de surexprimer de manière exogène chez la bactérie une protéine membranaire sous forme de corps d'inclusion, l'utilisation de détergent est nécessaire et indispensable dans le processus de renaturation de la protéine. Le grand dilemme est que la présence de détergent nécessaire à la solubilisation des protéines membranaires va à l'encontre même de la base du principe de cristallisation en diminuant les interactions protéines-protéines. En effet, la technique de diffraction aux rayons X de cristaux de protéines est la technique la plus couramment utilisée pour connaître la structure à haute résolution d'une protéine membranaire. Cependant, d'autres techniques, telles que la spectroscopie de RMN ou la diffraction électronique progressent également de jour en jour dans ce domaine d'étude (Lacapere *et al.*, 2007). L'ensemble de ces techniques, bien qu'extrêmement résolutive, sont fastidieuses à mettre en œuvre et nécessitent dans certains cas plusieurs années de mise au point. Le besoin de développer de nouvelles approches et techniques expérimentales en vue d'étudier à l'échelle moléculaire la conformation des protéines membranaires en solution et dans leur environnement lipidique s'est révélé important. Dans cet objectif, j'ai participé à la mise au point de la technique d'HDX-MS appliquée à l'étude conformationnelle de protéines membranaires mitochondriales principalement l'Ancp, le PiC et le VDAC.

La structure 3D à haute résolution du complexe Transporteur-CATR bovin a été résolue en 2003 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). La structure montre une cavité dans laquelle est fixé l'inhibiteur. Ce travail a été une avancée considérable dans la compréhension des transporteurs mitochondriaux, mais cette structure ne répond pas à toutes nos attentes puisqu'elle ne donne que « 50% » des éléments de réponse concernant le mécanisme de translocation de l'ADP et de l'ATP mimé par les complexes transporteur-CATR et transporteur-BA (Klingenberg, 2008). Compte tenu des difficultés rencontrées dans la cristallisation du complexe BA, nous avons opté pour une toute autre approche basée sur l'étude de la dynamique conformationnelle du transporteur bAnc1p par HDX-MS. Ce travail a fait l'objet de la thèse de Martial Rey et les résultats obtenus ont permis d'une part de valider nos résultats puisque les données d'accessibilités corrélaient celles structurales et biochimiques disponibles dans la littérature, et d'autre part de proposer un modèle du conformère BA bovin, illustré dans la **Figure I.26**. Ce modèle repose sur une fermeture de la cavité du côté intermembranaire et une ouverture du côté matriciel dans le complexe bAnc1p-BA (Rey *et al.*, 2010a). Cependant, le modèle Bovin a ses limites. En effet, les approches de biologie moléculaire sont rendues difficiles par la nature du

modèle biologique. Ainsi, la majeure partie des résultats obtenus sur les Ancp concerne ceux de levure où la génétique est grandement facilitée. Pour l'ensemble de ces raisons je me suis donc intéressé au cours de ma thèse à la dynamique conformationnelle de l'Ancp2 de levure au travers d'études structure / fonction. J'ai pu confirmer par HDX-MS que les complexes ScAnc2p-BA et ScAnc2p-CATR présentaient des différences conformationnelles importantes suggérant des structures différentes. En combinant les données des approches de mutagenèse dirigée avec celles obtenues en HDX-MS, j'ai pu montrer qu'une différence d'accessibilité au solvant d'une fine partie de ScAnc2p pouvait être associée à une fonction dans le mécanisme du transport des nucléotides adényliques. Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications, la première dans « *The Journal Of The Biological Chemistry* » et la seconde est en cours de soumission dans « *Biochimie* ». De plus, ces travaux ont d'autre part été l'occasion d'obtenir les premières données d'accessibilité au solvant du PiC de levure solubilisé en Triton X-100. Enfin, une autre partie de mon projet de thèse concerna l'étude du VDAC de levure en HDX-MS afin d'obtenir des informations sur son accessibilité au solvant une fois soluble dans un détergent. L'obtention de structures à haute résolution a donné une autre dimension à ce projet puisque les résultats obtenus, non sans de nombreuses difficultés, en HDX-MS ont pu être directement confrontés à ceux structuraux.



**Figure I.26 : Modèle du mécanisme de transport de l'ADP proposé suite à l'analyse du transporteur bAnc1p en HDX-MS.** Un modèle du mécanisme de transport dans la membrane interne mitochondriale a été proposé, dans lequel le transporteur passe d'une conformation ouverte vers l'espace intermembranaire et fermée du côté matriciel (le conformère CATR) à une conformation ouverte vers la matrice et fermée du côté intermembranaire (le conformère BA) *via* un mécanisme moléculaire assimilé à un diaphragme. Il a été proposé que les boucles matricielles soient relocalisées dans la matrice mitochondriale ou contre la membrane interne mitochondriale dans le conformère BA (non visible sur la figure). Modèle simplifié se limitant aux hélices impaires H1, H3 et H5 (Rey *et al.*, 2010a).



# Partie II

## Matériel et Méthodes

### Sommaire

---

<b>II.1 Matériel biologique</b> .....	<b>81</b>
II.1.1 Souches de levures et de bactéries.....	81
II.1.2 Conditions de culture et milieux utilisés (levures et bactéries) .....	82
II.1.3 Détermination des courbes de croissance des levures .....	82
<b>II.2 Techniques de biologie moléculaire</b> .....	<b>83</b>
II.2.1 Plasmides utilisés.....	83
II.2.2 Amplification d'un fragment d'ADN par PCR .....	83
II.2.3 Digestion d'un brin d'ADN par des enzymes de restriction .....	84
II.2.4 Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose .....	84
II.2.5 Préparation du plasmide (« miniprep ») .....	84
II.2.6 Ligature.....	85
II.2.7 Transformation levures/bactéries .....	85
II.2.7.1 Levures .....	85
II.2.7.2 Bactéries .....	85
II.2.8 Extraction d'un plasmide de levure (ce travail).....	86
II.2.9 Séquençage des inserts d'ADN .....	87
<b>II.3 Techniques de biochimie</b> .....	<b>87</b>



II.3.1 Dosage des protéines .....	87
II.3.2 Analyse des protéines par SDS-PAGE .....	87
II.3.3 Coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées par SDS-PAGE .....	88
II.3.4 Immunorévélation des protéines séparées par SDS-PAGE .....	88
II.3.5 Préparation des mitochondries de levure .....	89
II.3.6 Dosage des cytochromes mitochondriaux .....	91
II.3.7 Titration des sites de fixation de l' [ ³ H]-ATR dans les mitochondries .....	91
II.3.8 Titration des sites CATR par fluorescence extrinsèque (N-ATR, N-ADP) dans les mitochondries .....	92
II.3.9 Titration des sites N-ADP dans les mitochondries .....	92
II.3.10 Titration des sites de fixation de l' [ ¹⁴ C]-ADP dans les mitochondries .....	93
II.3.11 Mesure de l'activité de transport ADP/ATP dans les mitochondries .....	93
II.3.12 Test d'accessibilité de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p en ELISA .....	94
II.3.13 Purification de ScAnc2p et mesure des changements de conformation de la protéine isolée par fluorescence intrinsèque des tryptophanes .....	94
II.3.14 Purification des complexes transporteur-inhibiteur pour l'étude en HDX-MS .....	95
II.3.15 Purification de ScAnc2p portant une étiquette polyhistidine .....	96
II.3.16 Digestion de ScAnc2p par des protéases acides .....	96
II.3.17 Deutération de ScAnc2p complexé à ses inhibiteurs .....	97
II.3.18 Purification rapide de la porine ScVDAC1 .....	97
II.3.19 Purification de la porine ScVDAC1 portant une étiquette polyhistidine .....	98
II.3.20 Digestion de ScVDAC11 par la pepsine .....	98
II.3.21 Deutération de ScVDAC1 en solution de détergent .....	98
<b>II.4 Techniques de spectrométrie de masse (SM) .....</b>	<b>99</b>
II.4.1 Solvants et matériels utilisés lors des chromatographies liquides (LC) et des analyses en SM .....	99
II.4.2 Préparation des échantillons pour le MALDI .....	99
II.4.3 Montage de la ligne LC et élimination du détergent .....	99
II.4.4 Expérience de LC-MSMS .....	102
II.4.5 Analyse par LC-MS .....	102
II.4.5.1 Protéine entière .....	102
II.4.5.2 Protéine digérée .....	103
II.4.6 Analyse de la deutération des peptides .....	103

## II.1 Matériel biologique

### II.1.1 Souches de levures et de bactéries

Le travail présenté a été réalisé à partir de plusieurs souches de levure, certaines d'entre elles ont été fournies par l'équipe du Pr G. J.-M. Lauquin (IBGC, Bordeaux), d'autres étaient déjà disponibles au laboratoire. Il s'agit des souches *W303-1B*, *JL1-3*, *JL1Δ2Δ3u⁻*, *JL1-3 ANC2*, *JL1-3 ANC2(His₆)*, *JL1-3-ΔPORA1*, *JL1-3-ANC2ΔPORA1*, *DBY 747*, *B5-10a* (notée *ΔPORA1*) et *V-HT*. Leurs phénotypes sont résumés dans le **Tableau II.1**. D'autres souches ont été construites pendant ce travail de thèse, il s'agit de souches *K317*, *M309*, *K317-ΔW*, *W316*, *scanc2/MMA*, *scanc2/MAM*, *scanc2/AMM*, *scanc2/MAA*, *scanc2/AAM*, *scanc2/AMA* et *scanc2/AAA*. Leurs phénotypes sont décrits dans la première section de la partie Résultats.

Souches	Génotypes
<i>W303-1B</i>	<i>MATa, leu2-3, 112, his3-11, 15, ade2-1, trp1-1, ura3-1, can1-100</i>
<i>JL1-3</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2 anc2::HIS3 anc3::URA3</i>
<i>JL1-3-ANC2</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2, anc3::URA3, ANC2</i>
<i>JL1-3 ANC2(His₆)</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2, anc3::URA3, ANC2HIS</i>
<i>JL1-3-ΔPORA1</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2 anc2::HIS3 anc3::URA3 POR1::HIS3</i>
<i>JL1-3-ANC2ΔPORA1</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2 anc3::URA3 POR1::HIS3, ANC2</i>
<i>JL1Δ2Δ3u⁻</i>	<i>W303-1B anc1::LEU2 Δanc2::HIS3 Δ[269-975]anc3</i>
<i>DBY 747</i>	<i>MATa, leu2-3, 112, his3-1, trp1-289, ura3-52</i>
<i>B5-10a</i> , notée <i>ΔPORA1</i>	<i>DBY 747, por1::URA3</i>
<i>V-HT</i>	<i>ΔPORA1</i> complémenté à l'aide du plasmide pRS-YEP-PORA1-HT (Thèse Agathe Spira Afchain)

**Tableau II.1 : Récapitulatif du génotype des souches de levures utilisées**

Les souches d'*Escherichia coli* employées au cours de ce travail sont les souches commerciales DH5α et TOP10 utilisées pour l'amplification de plasmides. Leur génotype est présenté dans le **Tableau II.2** ci-après.

Souches	Génotypes
<i>DH5α (Invitrogen)</i>	$F^- \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$
<i>Top10 (Invitrogen)</i>	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 nupG recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 \lambda^-$

**Tableau II.2 : Récapitulatif du génotype des souches de bactéries *E. coli*.**

### II.1.2 Conditions de culture et milieux utilisés (levures et bactéries)

Les cellules de levures sont cultivées sous agitation (200 tours/minute) à 28°C dans des milieux riches ou sélectifs, fermentescibles ou non, solides ou liquides, préalablement stérilisés dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C sous un bar de pression. Les milieux riches sont composés de 2% (p/v) bactopectone (Difco), 1% (p/v) extraits de levure (Difco) et de 2% (p/v) glucose (Sigma Aldrich) ou galactose (Sigma Aldrich) pour les milieux fermentescibles ou 2% (p/v) lactate (Fluka), 1% (p/v)  $KH_2PO_4$  (Sigma Aldrich), pH 5,5 ajusté à la potasse pour les milieux non-fermentescibles. Les milieux sélectifs sont composés de 6,7 g/L de « *Yeast Nitrogen Base* » (YNB, MP Bio), de glucose, de galactose ou de lactate/KPi comme indiqué pour les milieux riches et de 0,74 g/L d'un mélange d'acides aminés dépourvu de tryptophane (CSM-W, BIO101). Les bactéries sont cultivées sous agitation (200 tours/minute) à 37°C dans un milieu Luria Bertani (LB) 25 g/L stérilisé de la même manière que les milieux utilisés pour la croissance des levures et supplémenté ou non avec des antibiotiques (ampicilline 100 mg/L) avant utilisation. Dans le cas de cultures sur milieux solides, tous les milieux décrits ci-dessus sont supplémentés avec 2% (p/v) de bacto-agar (Difco).

### II.1.3 Détermination des courbes de croissance des levures

Une pré-culture de 10 mL de la souche à étudier estensemencée avec des clones prélevés sur milieu solide et laissée à 28°C sous agitation jusqu'en phase stationnaire. Un volume de 50 mL de culture estensemencé à une  $D.O_{600nm}$  initiale de 0,05 à 0, 1 dans les conditions de cultures décrites précédemment et des aliquots de 1 mL sont prélevés régulièrement afin de suivre l'évolution de la  $D.O_{600nm}$ . Chaque prélèvement est centrifugé 5 minutes à 16000 g et le culot de levure est resuspendu dans le même volume d'eau distillée avant lecture de la  $D.O.$

## II.2 Techniques de biologie moléculaire

### II.2.1 Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés dans cette étude sont principalement des plasmides « navettes » (type pRS314) capables de se répliquer dans les bactéries et dans les levures (Sikorski et Hieter, 1989). Dans le cas de l'étude des Ancp, les plasmides utilisés comportent les régions promotrices et terminatrices du gène de levure *ScANC2* (Le Saux *et al.*, 1996). Un gène peut être inséré entre le promoteur et le terminateur grâce aux sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI. C'est ainsi que sera réalisé le clonage des gènes mutés ou non de l'Ancp. Dans le cas de l'étude du VDAC de levure étiqueté par un peptide poly-histidine à son extrémité C-terminale (voir § II.3.19), l'expression du gène est sous le contrôle du promoteur et du terminateur constitutif *PMAl* de la H⁺-ATPase de levure introduits dans le plasmide pRS-YEp dérivé du plasmide pRS314. Les caractéristiques du plasmide pRS-YEp sont décrites dans les travaux de (Rey *et al.*, 2007).

### II.2.2 Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

La technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier *in vitro* à l'aide d'ADN polymérases thermostables un fragment d'ADN (matrice) situé entre deux oligonuléotides (amorces) complémentaires de l'extrémité 3' des deux brins de la matrice à amplifier (Mullis *et al.*, 1986). Dans ce travail, deux types d'ADN polymérases ont été utilisés : la Taq polymérase (Fermentas), employée pour la mise au point des conditions de PCR ou pour les PCR de contrôle, et la polymérase Vent (BioLabs) utilisée dans le cas du clonage des gènes d'intérêt. Les différentes amorces utilisées sont répertoriées dans la section « Material and methods » des articles 1 et 2. En résumé, une petite quantité du fragment d'ADN à amplifier est mis en présence de 20 pmoles d'amorces, 0,8 mM du mélange des 4 dNTPs et de 1 µL d'ADN polymérase dans un tampon adéquat. Le mélange est dénaturé pendant 10 minutes à 95°C puis soumis à une répétition de 30 à 40 cycles contenant 3 étapes d'une minute chacune. La première étape du cycle est une dénaturation à 95°C. Elle est suivie d'une étape d'hybridation des amorces sur les brins d'ADN matrice réalisée à une température 5°C inférieure à la température de fusion des amorces. La dernière étape du cycle est l'étape d'amplification réalisée à 72°C. A la fin des 30 à 40 cycles, une élongation finale est réalisée

à 72°C pendant 10 minutes afin de compléter les fragments incomplets. La température du mélange réactionnel est ensuite abaissée à 4°C.

### II.2.3 Digestion d'un brin d'ADN par des enzymes de restriction

L'extraction d'un gène contenu dans un plasmide ou la linéarisation d'un plasmide circulaire s'effectuent par digestion à l'aide d'enzymes de restriction. Les digestions de plasmides ou d'inserts issus d'une amplification par PCR sont réalisées à 37°C pendant 1 heure dans les conditions recommandées par le fournisseur par des enzymes de restriction (Fermentas). Classiquement, 2 µL de plasmide issu d'une « miniprep » (réalisée avec le kit Qiagen) sont digérés par 0,5 µL de *Bam*HI et 0,5 µL d'*Eco*RI dans le tampon tango™ (Fermentas) concentré 2 fois dans un volume final de 10 µL.

### II.2.4 Séparation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les brins d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose immergé. Le gel est composé d'agarose 1% (p/v) dissous à chaud dans un tampon TAE contenant 20 mM Tris, 10 mM acide acétique, 0,5 mM EDTA, pH 8,5. Les échantillons à analyser sont dilués dans un tampon de charge contenant 0,25% (p/v) bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) xylène cyanol, 40% (p/v) glucose puis déposés dans le gel et soumis à une tension de 100 V pendant environ 30 minutes. Après l'électrophorèse, le gel est placé pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à environ 0,5 µg/mL et observé sous rayonnement ultra-violet (UV). Le nombre de paires de bases contenues dans les brins d'ADN est estimé par comparaison avec un marqueur contenant des brins d'ADN à une taille standard (1 Kb DNA ladder, Fermentas) soumis à la même électrophorèse. Cette technique permet aussi de purifier un produit PCR. Pour cela, une bande d'agarose contenant un fragment d'ADN d'intérêt est excisée au scalpel et le fragment est purifié à l'aide du kit de purification « *High Pure PCR Product Purification Kit* » (Roche).

### II.2.5 Préparation du plasmide (« miniprep »)

L'extraction et la purification d'un plasmide bactérien « miniprep » sont basées sur une lyse alcaline des bactéries et s'effectuent selon le protocole du kit « *QIAprep Spin Miniprep Kit* » (Qiagen).

## **II.2.6 Ligature**

L'insert et le vecteur coupés par les mêmes enzymes de restriction et purifiés sont soumis à une étape de ligaturation pour obtenir un plasmide circulaire contenant l'insert. Pour ce faire, environ 50 ng de plasmide et 25 ng d'insert sont mélangés en présence d'1 µL de ligase (T4 DNA ligase, Roche) dans un tampon recommandé par le fournisseur. Le mélange est laissé toute la nuit à 16°C ou 2 heures à température ambiante.

## **II.2.7 Transformation levures/bactéries**

### **II.2.7.1 Levures**

Le protocole suivi est celui proposé avec le kit de transformation de levure utilisé (BIO101). Une colonie de levure est mise en culture dans un milieu riche glucose (YPD) entre 12 et 24 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 g pendant 5 minutes et le milieu de culture est éliminé. Le culot de cellules est repris dans 9 mL de tampon Tris-EDTA (TE) pH 7,5 et centrifugé une nouvelle fois. Le culot cellulaire est ensuite repris délicatement dans 5 mL de solution « lithium/acétate de césium » (fournie dans le kit commercial Qbiogene) et agité légèrement pendant 30 minutes à 30°C. Les cellules sont à nouveau centrifugées et le culot est resuspendu dans 1 mL de TE pH 7,5. La transformation de 100 µL de cellules ainsi préparées s'effectue à température ambiante en ajoutant 5 µL d'une solution d'ADN « guide » (sperme de saumon), 5 µL d'une solution d'histamine et entre 0,01 et 1 µg de plasmide d'intérêt. Après 15 minutes d'incubation, 1 mL d'une solution contenant 0,8 mL de PEG (polyéthylène glycol) et 0,2 mL de « TE/Cation MIXX » (fourni dans le kit commercial Qbiogene) est ajouté aux cellules de levures. Le mélange est laissé à 30°C pendant 10 minutes. Après un choc thermique à 42°C pendant 10 min, les cellules sont centrifugées et le culot est repris dans 200 µL de milieu SOS (fourni dans le kit commercial Qbiogene) puis étalé sur un milieu solide sélectif.

### **II.2.7.2 Bactéries**

Les bactéries sont obtenues déjà compétentes (TOP10, Invitrogen), ou sont rendues compétentes par le traitement suivant (DH5α, Invitrogen) : une culture de 100 mL de bactéries en milieu LB estensemencée à 0,1 D.O._{600 nm} à partir d'une préculture à saturation et

placée dans un incubateur sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une D.O._{600 nm} de 0,6. Les cellules sont alors refroidies puis centrifugées à 6000 g et à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est repris dans 100 mL de tampon froid composé de 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0 puis centrifugé dans les mêmes conditions. Il est ensuite repris dans 50 mL d'une solution de CaCl₂ à 30 mM et placé pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont alors centrifugées à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C puis le culot est resuspendu dans du glycérol 1% (v/v). Les cellules sont fractionnées en aliquots de 200 µL et congelées rapidement dans l'azote liquide pour être conservées ensuite à -80°C jusqu'à utilisation. Un mélange de 5 µL d'une « miniprep » du plasmide d'intérêt et de 50 µL de bactéries compétentes est incubé entre 15 et 20 minutes dans la glace. Ensuite, les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. 300 µL de milieu LB sont ensuite ajoutés et les cellules sont cultivées sous agitation à 37°C pendant 1 heure. Elles sont centrifugées à 1500 g pendant 5 minutes et le culot est repris dans 100 µL de milieu LB puis étalé en deux fractions de 10 et 90 µL sur des boîtes LB-antibiotique (en général de l'ampicilline) qui sont mises à l'étuve à 37°C sur la nuit.

### **II.2.8 Extraction d'un plasmide de levure (ce travail)**

La méthode d'extraction d'ADN de levure est basée sur celle utilisée de manière courante chez la bactérie et repose sur des étapes successives d'élimination des composés protéiques et lipidiques et de purification de l'ADN génomique et plasmidique. Ainsi, la souche de levure est cultivée dans 50mL de milieu YPL à 28°C sous agitation. Les cellules sont collectées en fin de phase exponentielle par centrifugation (1500g pendant 10 minutes) et lavées à l'eau distillée. Le culot de levure (environ 0,5g) est ensuite traité afin d'obtenir des sphéroplastes (**voir § II.3.5**). Ces derniers sont lysés au bain marie 30 min à 65°C dans du tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1% SDS (à raison de 1 mL de solution de lyse pour 1 g de cellule) puis plongés quelques minutes dans la glace. Un volume d'un mélange Chloroforme/phénol/eau 25/24/1 (v/v/v) est ajouté. L'émulsion obtenue est ensuite agitée puis centrifugée 10 minutes à 13000 g. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée. L'ajout de 2,5 volumes d'éthanol à 100% et de LiCl 8M (concentration finale de 0.2M) permet de précipiter l'ADN. L'ensemble est incubé à froid pendant 1h à -20°C puis centrifugé 10 minutes à 13000 g à 4°C. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol à 70% sans le resuspendre. Après une nouvelle centrifugation, l'ADN est enfin repris dans 200µL d'eau. Des bactéries TOP10 ou DH5α seront transformées selon le protocole décrit au § **II.2.7.2** par 5µL d'ADN de levure contenant le plasmide d'intérêt.

### II.2.9 Séquençage des inserts d'ADN

Les polymérases utilisées dans les PCR peuvent faire des erreurs lors de l'amplification et créer des mutations non souhaitées au sein du gène d'intérêt. Afin de vérifier leur qualité, les gènes ainsi produits et introduits dans le plasmide pRS314 ont été séquencés par la société Cogenics (Meylan) à l'aide des amorces *Anc2Prom* (AATACATCTACAAGTCAAAGGAG) et *Anc2Term* (CAAAACAAATCGTGTCACTCATT) localisées respectivement dans les parties promotrice et terminatrice du gène sauvage *ScANC2*.

## II.3 Techniques de biochimie

### II.3.1 Dosage des protéines

Les protéines totales d'un échantillon sont dosées par une technique colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique, ou BCA (Smith *et al.*, 1985). En milieu alcalin, une liaison peptidique provoque la réduction de l'ion cuivrique selon la réaction du Biuret. La réaction entre le sel de sodium de l'acide bicinchoninique et l'ion cuivreux est sensible et très spécifique. Le complexe formé  $\text{BCA-Cu}^+$  est soluble dans l'eau et montre une forte absorption à 562 nm. Les protéines à doser (100  $\mu\text{L}$  de prise d'essai) sont laissées quelques minutes dans un bain-marie en présence de 900  $\mu\text{L}$  de réactif préparé extemporanément contenant 1 volume de solution de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  à 4% (p/v) et 50 volumes de la solution de BCA commerciale (Sigma-Aldrich,  $\text{BCA-Na}_2$  1% (p/v),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  25% (p/v), tartrate de sodium 0,16% (p/v),  $\text{NaOH}$  0,4% (p/v),  $\text{NaHCO}_3$  0,95% (p/v), pH 11,25). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par comparaison avec une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA), allant de 0 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines dosées dans les mêmes conditions.

### II.3.2 Analyse des protéines par SDS-PAGE

Les protéines sont séparées en conditions dénaturantes par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS (Laemmli, 1970). La migration de protéines de masses moléculaires connues (pré-colorées dans le cas d'une révélation par Western-blot, voir ci-après) au sein du même gel permet d'estimer la masse des protéines. On ajoute aux protéines à analyser du tampon de dissociation (4X) composé de 250 mM Tris-HCl, glycérol 40% (p/v), SDS 8% (p/v),  $\beta$ -mercaptoéthanol 1% (v/v), 0,01% (p/v) bleu de bromophénol, pH



6,8. Entre 5 et 20  $\mu$ L d'échantillon sont déposés sur le gel de polyacrylamide composé de deux parties. La première destinée à concentrer les protéines est composée d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide respectivement à 4% (p/v) et à 0,1% (p/v), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1% (p/v), persulfate d'ammonium (APS) 0,1% (p/v), N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED) 0,1% (v/v). La seconde partie, destinée à séparer les protéines selon leur masse moléculaire, est composée d'un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide respectivement à 12% (p/v) et à 0,3% (p/v), 500 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), APS 0,1% (p/v), TEMED 0,1% (v/v). Les protéines vont migrer dans le gel sous l'effet d'un courant électrique d'intensité constante (20 mA par gel) appliqué pendant une heure environ dans un tampon de migration composé de 750 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS, 50 mM Tris pH 8,4.

### **II.3.3 Coloration au bleu de Coomassie des protéines séparées par SDS-PAGE**

Une fois l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisée, les protéines peuvent être révélées par coloration au bleu de Coomassie. Pour cela, le gel d'acrylamide est immergé dans un bain contenant une solution de bleu de Coomassie R250 à 0,25% (p/v) dans 40% (v/v) éthanol et 10% (v/v) acide acétique (Diezel *et al.*, 1972). L'excès de colorant est éliminé par incubation du gel dans 5% (v/v) éthanol et 7% (v/v) acide acétique.

### **II.3.4 Immunorévélation des protéines séparées par SDS-PAGE**

Les protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide peuvent être transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) ou de nitrocellulose afin d'être révélées par des anticorps (Towbin *et al.*, 1979). Pour cela, le gel est placé entre deux feuilles de papier « Whatmann » au contact de la membrane (préincubée quelques minutes dans de l'éthanol pour la membrane de PVDF), et maintenu en place entre des mousses au sein d'une cassette. Le sandwich réalisé est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert composé de 375 mM glycine, 0,05% (p/v) SDS, 25 mM Tris pH 8,4, 20% (v/v) éthanol et mis sous ampérage constant (200 mA) pendant 1 heure. Une fois l'électrotransfert réalisé, la membrane est maintenue sous agitation pendant une heure dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) supplémenté par 3% (p/v) de lait écrémé. Après 3 lavages de 5 min avec du PBST (PBS complété avec 0,05% (p/v) de Tween 20), la membrane est traitée pendant 1 heure par des anticorps dirigés contre la protéine à

révéler (**Tableau II.3**). Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont des anticorps polyclonaux produits chez le lapin, dirigés contre différentes parties de ScAnc2p et de ScVDAC. La membrane est ensuite lavée 5 fois avec du PBST puis mise à incuber dans une solution de protéine A (*Staphylococcus aureus*) couplée à la peroxydase de raifort (HRP) (Protein A-HRP Conjugate, BioRad diluée 3000 fois). Après 3 lavages avec du PBST, les protéines sont révélées par détection de l'activité peroxydase grâce à un kit ECL (« *Enhanced Chemi Luminescence* », Amersham). La peroxydase va oxyder le luminol contenu dans la solution du kit ECL en présence d'H₂O₂ et libérer un photon qui va impressionner un film photographique (« *Biomax Light, Kodak* »).

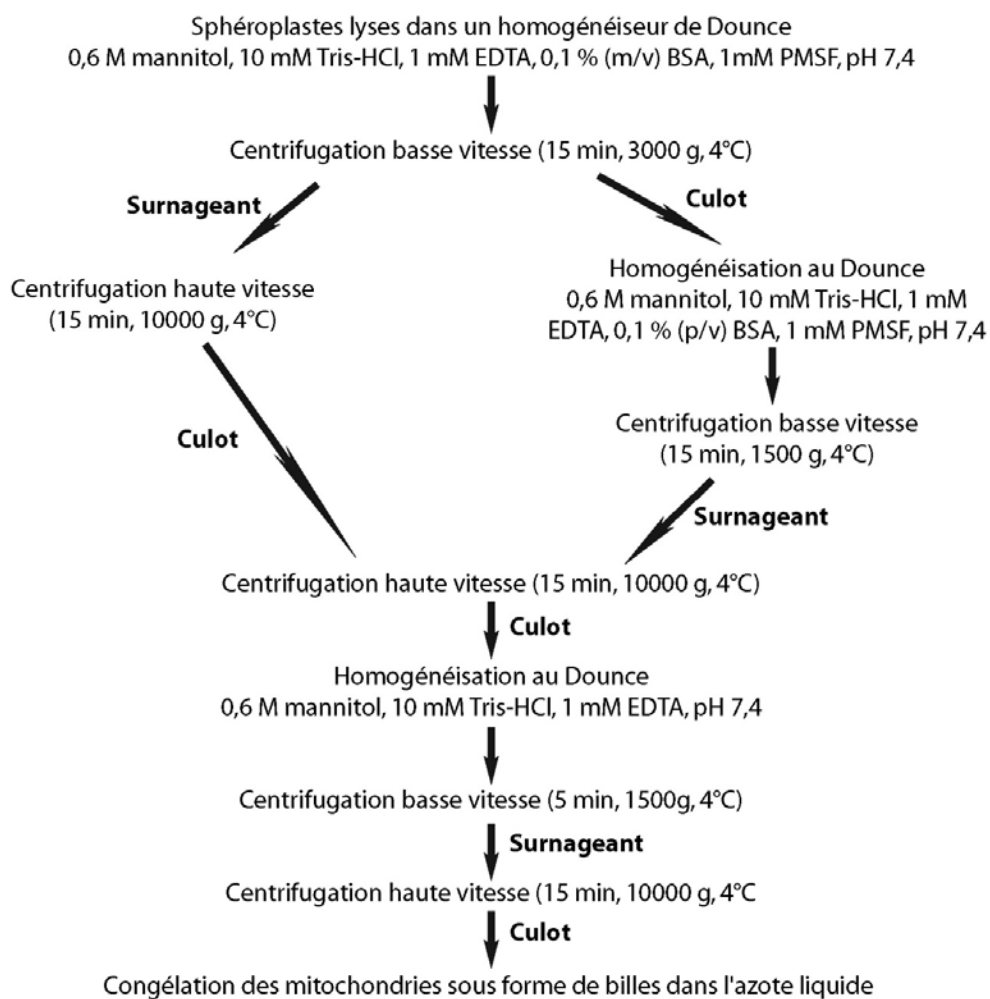
Protéines	Nom	Dilution	Remarques	Référence
<b>Transporteur d'ADP/ATP</b>	$\alpha$ -ScAnc2p	1/1000	Anticorps dirigés contre ScAnc2p solubilisé en SDS	(Fiore <i>et al.</i> , 2000)
	$\alpha$ -ScAnc2pCter	1/2000	Anticorps dirigés contre les 14 derniers résidus C-terminaux de la protéine ScAnc2p (peptide YDQLQMILFGKKFK)	(Cléménçon <i>et al.</i> , 2008)
<b>Porine VDAC1</b>	$\alpha$ -ScVDAC1	1/1000	Anticorps dirigés contre ScVDAC solubilisé en SDS	(Lauquin G.J.-M. non publié)

**Tableau II.3 : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés.** Les anticorps sont conservés dans 50% (p/v) glycérol à -20°C. Les dilutions effectuées dans du PBST peuvent être conservées à 4°C en présence de 0,05% (p/v) NaN₃ et utilisées plusieurs fois.

### II.3.5 Préparation des mitochondries de levure

L'isolement des mitochondries de levure s'effectue en deux étapes : la première est destinée à digérer la paroi des levures, la seconde à lyser mécaniquement les cellules pour en extraire les mitochondries (Daum *et al.*, 1982). Ainsi, pour préparer une fraction enrichie en mitochondries de levure, une culture de *S. cerevisiae* est arrêtée en phase exponentielle de croissance (entre 5 et 6 de densité optique) par centrifugation à 1500 g pendant 15 min à 20°C. Après un lavage à l'eau et une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, le culot cellulaire est traité pendant 30 minutes à 30°C par un milieu réducteur contenant 100 mM Tris-HCl, 10 mM dithiothréitol (DTT), pH 9,4 à raison de 0,5 g de cellules/mL de milieu, ceci afin de fragiliser la paroi cellulaire. Après centrifugation (10 minutes, 1500 g, 20°C), les cellules sont lavées dans 1,2 M sorbitol puis centrifugées dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu contenant 1,2 M sorbitol, 20 mM KH₂PO₄,

pH 7,3 à raison de 0,3 g de cellules/mL de milieu. Les parois des cellules sont digérées à 37°C par l'action de la Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation) ajoutée dans le milieu à raison 5 mg/g de cellules humides. La cinétique de digestion est suivie en mesurant la densité optique (D.O.) à 600 nm d'une prise d'essai de 20 µL diluée dans 2 mL d'eau distillée et pendant 2 minutes. Lorsque la valeur de la D.O. atteint 20% de la valeur initiale, la lyse est arrêtée par centrifugation (1500 g, 15 min, 20°C). Les sphéroplastes obtenus après digestion de la paroi cellulaire par la Zymolyase sont lavés deux fois dans un milieu sorbitol 1,2 M et centrifugés (1500 g, 10 min, 20°C), afin de supprimer le maximum de phosphate et de Zymolyase. Les sphéroplastes sont resuspendus dans un autre milieu contenant 0,6 M mannitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), 0,1% (p/v) BSA, 1 mM fluorure de phényl méthanesulfonyle (PMSF) et rompus mécaniquement par dix aller-retours de piston dans un homogénéisateur de Dounce. La suite de l'extraction est réalisée par une série de centrifugations différentielles dont l'enchaînement est résumé dans la **Figure II.1**.



**Figure II.1 : Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries de levure.**

### II.3.6 Dosage des cytochromes mitochondriaux

Le contenu des mitochondries en cytochromes peut être mesuré par la différence d'absorption d'une suspension de mitochondries placées dans un milieu réducteur ou oxydant. Les mitochondries sont diluées à 4 mg/mL en présence de 100 mM Na₂SO₄, 10 mM Tris à pH 7,3, 1 mM EDTA et 0,5% DDM (p/v) et ce lysat est soit réduit par l'ajout d'hydrosulfite de sodium en poudre soit oxydé par l'ajout de ferricyanure en poudre. Le détergent permet de s'affranchir de la turbidité du milieu qui conduit à une importante dérive des mesures au cours de l'enregistrement. Les spectres des mitochondries oxydées et réduites sont enregistrés entre 650nm et 500nm dans des cuves de 1 mL. La différence de ces deux spectres permet de quantifier les différents cytochromes des mitochondries à partir de leurs coefficients d'extinctions molaires. Les mesures ont été réalisées dans un spectrophotomètre à double faisceau (Shimadzu UV-1605). On trouve à 605 nm les cytochromes *a* et *a3* dont le  $\Delta\epsilon(c^{2+}-c^{3+})_{605nm}$  vaut 24000 M⁻¹ cm⁻¹,  $\epsilon(c^{2+})_{550nm} = 29000$  M⁻¹ cm⁻¹,  $\epsilon(c^{2+})_{416nm} = 129000$  M⁻¹ cm⁻¹,  $\epsilon(c^{3+})_{410nm} = 106000$  M⁻¹ cm⁻¹.

### II.3.7 Titration des sites de fixation de l' [³H]-ATR dans les mitochondries

L'ATR tritié a été obtenu selon le protocole décrit par (Brandolin *et al.*, 1974). Les expériences de fixation d' [³H]-ATR ont été réalisées dans les conditions décrites par (Block *et al.*, 1981). Les mitochondries de levures sont diluées dans un milieu isotonique composé de 120 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM, Tris-HCl, pH 7,4 pour atteindre une concentration finale en protéines totales de 10 mg/mL. Deux séries de titrations sont réalisées en parallèle sur des mitochondries préalablement inhibées ou non avec du CATR (20 µM final) afin de pouvoir mesurer la fixation non spécifique de l'inhibiteur radioactif. Les mitochondries des différentes séries sont mises en présence de concentrations croissantes d' [³H]-ATR allant de 0,022 µM à 3,3 µM et laissées à agiter sur une roue à 4°C pendant 1 heure. Après centrifugation des mitochondries radiomarquées pendant 10 minutes à 16000 g et à 4°C, le surnageant est retiré et les parois du tubes sont rincées rapidement avec de l'eau distillée. Le culot de mitochondries est lysé par 500 µL d'un milieu contenant 500 mM NaCl, 4% (v/v) Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 puis transféré dans un flacon à scintillation. Le tube ayant contenu les mitochondries est rincé une fois avec 500 µL de milieu de lyse qui sont ajoutés par la suite dans le tube à scintillation. La radioactivité présente au niveau des mitochondries

est comptée pendant 10 minutes par scintillation liquide. La fixation spécifique de l'['³H]-ATR est donnée par la différence entre la radioactivité incorporée dans la série sans et avec CATR, puis analysée par une représentation de Scatchard.

### **II.3.8 Titration des sites CATR par fluorescence extrinsèque (N-ATR, N-ADP) dans les mitochondries**

Le transporteur est bloqué dans un état conformationnel grâce un inhibiteur fluorescent dérivé de l'ATR, le 6'-*O*-naphtoyl-atractyloside (N-ATR) ou de l'ADP, le 3'-*O*-naphtoyl-ADP (N-ADP) qui présentent des affinités moindres pour le transporteur. Pour cette étape, les mitochondries (10 mg/mL) sont incubées 5 minutes dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,3 contenant 5 mM de N-ATR (ou de N-ADP), 100 mM de Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 10% (v/v) de glycérol, 1 mM de diisopropylfluorophosphate (DFP) et un cocktail d'antiprotéases (Roche). Pour des raisons de mesure optique, le volume réactionnel est ensuite complété à 2 mL dans un tampon Tris 10 mM, pH 7,3 contenant 0,15 M de KCl et 1 mM d'EDTA. Le mélange est ensuite placé dans un spectrofluorimètre Biologic (lampe Xe-Hg) couplé à une table traçante REC80 Servograph (Radiometer Copenhagen) et excité à une longueur d'onde de 312 nm (longueur d'onde d'excitation du résidu naphtoyl). La fluorescence émise est alors récupérée et amplifiée jusqu'à produire un signal analogique de 5 à 7V. Des ajouts successifs de 25 pmoles de CATR sont effectués afin de chasser le N-ATR ou le N-ADP fixé sur le transporteur et la différence de fluorescence induite ( $\Delta F$ ) par sa libération dans le milieu est mesurée. Le calcul des valeurs de  $\Delta F/\Delta F_{\max}$ , en fonction des concentrations de CATR ajouté, nous permet de déduire le nombre de sites capables de fixer le CATR dans l'extrait mitochondrial. Le résultat obtenu reflète alors directement la quantité de transporteur actif présent dans les extraits mitochondriaux.

### **II.3.9 Titration des sites N-ADP dans les mitochondries**

Le transporteur est bloqué à l'aide de N-ATR. Les mitochondries sont incubées 5 minutes dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,3 contenant une gamme de concentrations finales en N-ADP de 0 à 55  $\mu$ M, 100 mM de Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 10% (v/v) de glycérol, 1 mM de DFP et un cocktail d'antiprotéases (Roche). La concentration finale en protéines est voisine de 10 mg/mL. Le protocole qui suit est identique à celui utilisé pour la titration des sites CATR à l'aide de N-ATR ou de N-ADP (**voir § II.3.8**). Au final, l'ajout d'un excès de CATR

(10  $\mu\text{M}$  finaux) est effectué afin de chasser l'intégralité du N-ADP fixé sur le transporteur et la différence de fluorescence induite ( $\Delta F$ ) par sa libération dans le milieu est mesurée. Le calcul des valeurs de  $\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$  est réalisé en fonction des signaux obtenus. Il est possible d'estimer une constante apparente de dissociation du N-ADP ( $K_{1/2}$ ) déterminée en représentant le  $\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$  en fonction des concentrations en N-ADP utilisées.

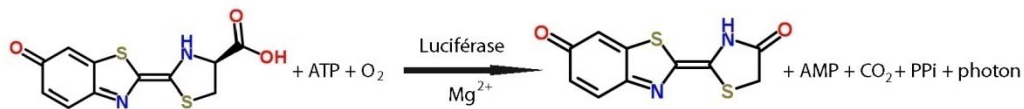
### II.3.10 Titration des sites de fixation de l' $[^{14}\text{C}]$ -ADP dans les mitochondries

La fixation de l' $[^{14}\text{C}]$ -ADP sur les Ancp a été étudiée par la technique de différenciation par le CATR décrite dans le § II.3.7. Lorsque l'équilibre isotopique est atteint, le déplacement des nucléotides induit par le CATR est identique à la fraction spécifiquement liée à l'Ancp. La gamme de concentration en  $[^{14}\text{C}]$ -ADP testée va de 0 à 200  $\mu\text{M}$  (concentration finale). La radioactivité incorporée de façon spécifique par les Ancp est déterminée comme exposé dans le § II.3.7.

### II.3.11 Mesure de l'activité de transport ADP/ATP dans les mitochondries

Les préparations de mitochondries peuvent être caractérisées en mesurant la capacité à exporter l'ATP produit par phosphorylation oxydative de l'ADP contenu dans l'espace matriciel des mitochondries. L'ATP exporté est dosé par l'action d'une protéine, la luciférase, qui catalyse l'oxydation d'un composé chimique, la luciférine, en oxyluciférine en hydrolysant l'ATP en AMP et pyrophosphate en présence de dioxygène et d'ions magnésium et en émettant un photon (**Figure II.2**) (Dassa *et al.*, 2005). L'émission de lumière est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Une préparation fraîche de mitochondries de *S. cerevisiae* est diluée dans milieu composé de 0,6 M mannitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 jusqu'à une concentration en protéines totales de 5 mg/mL. 10  $\mu\text{L}$  de cette suspension sont ajoutés à 2 mL de tampon contenant 0,6 M mannitol, 10 mM phosphate de potassium, 10 mM Tris, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EGTA, 1 mM  $\alpha$ -cétooglutarate, 4  $\mu\text{M}$  diadénosine pentaphosphate (Ap5A), 0,1% (p/v) luciférine (Roche), 0,1% (p/v) luciférase (Roche), pH 7,4. Après 3 minutes d'incubation à 25°C, le transport est déclenché par l'ajout dans le milieu réactionnel d'ADP à la concentration finale comprise entre 1 et 500  $\mu\text{M}$ . La cinétique de libération de l'ATP est exprimée en nanomoles par minute et par mg de protéines totales pour chaque concentration d'ADP ajoutée dans le milieu. La représentation de Michaelis-Menten permet de calculer la vitesse maximum d'échange apparente ( $V_{\text{max}}$ ) et le  $K_M$  apparent du

transporteur pour l'ADP externe dont la concentration libre est calculée grâce au logiciel MaxChelator (<http://maxchelator.stanford.edu>).



**Figure II.2 : Principe du dosage de l'ATP par le système luciférine-luciférase** En présence de Mg²⁺ et d'O₂, la luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Outre l'AMP, le pyrophosphate (P_{Pi}) et le CO₂, cette réaction entraîne la libération stœchiométrique d'un photon (hv).

### II.3.12 Test d'accessibilité de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p en ELISA

De 0 à 20 µg d'extraits mitochondriaux sont incubés dans un tampon hypotonique Tris-HCl, 10 mM, pH 7,4 contenant 10 mM de NaCl et 10 mM d'EDTA en présence ou en absence de 20 µM de CATR, de 20 µM de BA ou de 60 µM de N-ADP puis adsorbés 1 heure à 25°C sous agitation dans une microplaque 96 puits. Cette dernière est ensuite saturée dans du tampon PBST contenant 2,5% (p/v) de lait écrémé préalablement filtré sur une gaze. Un protocole identique à celui utilisé en Western blot a été suivi pour l'immunomarquage à l'aide d'anticorps α-ScAnc2pCter incubés dans une gamme de concentrations finales de 1/103^e au 1/105^e. La présence de la ProtA-HRP liée à l'anticorps primaire sur la plaque et plus précisément son activité peroxydase est révélée par ajout de 2 volumes d'un tampon acétate de sodium/acide citrique 100 mM, pH 6 contenant 0,1 g/L de tétraméthylbenzidine (TMB) dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et 0,005% (v/v) d'H₂O₂. La révélation est stoppée par ½ volume d'H₂SO₄, 2 M. L'absorbance dans chacun des puits est ensuite mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique Labsystems.

### II.3.13 Purification de ScAnc2p et mesure des changements de conformation de la protéine isolée par fluorescence intrinsèque des tryptophanes

ScAnc2p est purifié sous forme native d'après un protocole initialement décrit par (Fiore *et al.*, 2000). Des mitochondries fraîchement décongelées sont incubées pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DFP, du cocktail d'antiprotéases, 1% (m/v) final d'émulphogène BC720 (EM) et 1% (m/v) final de *n*-dodécyl-α-D-maltopyranoside (DDM). Après 10 min d'incubation à 4°C, la suspension est déposée sur une colonne d'hydroxyapatite

(HTP, Bio-Rad) préalablement équilibrée dans un milieu contenant 10 mM Tris-HCl à pH 7,3, 50 mM Na₂SO₄, 1 mM EDTA et 0,01% (m/v) EM, à raison de 1 ml de support décanté pour 2 mg de protéines mitochondriales totales. La fraction non-retenue sur la colonne, qui contient le transporteur, est ensuite collectée puis filtrée sur une colonne AcA202 équilibré dans le même tampon.

La fixation des inhibiteurs (CATR ou BA) et des nucléotides (ADP ou ATP) sur le transporteur isolé en présence de détergent entraîne des changements de conformation de la protéine que l'on peut visualiser par fluorimétrie des tryptophanes (Brandolin *et al.*, 1993). Les mesures des variations de fluorescence sont effectuées dans une cuvette en quartz de 2 mL contenant 1,2 mL de glycérol 1,25% (m/v) préalablement filtré et 0,8 mL de la solution de protéine en sortie de colonne AcA202 (soit à environ 0,3 mg/mL). La cuve est placée sous agitation permanente devant le faisceau de lumière d'excitation centrée à 297 nm et de bande passante 5 nm. L'intensité de la lumière émise est mesurée à 345 nm perpendiculairement au faisceau incident (transmission de 75%, largeur de 60 nm à 50% de transmission). Après stabilisation du signal, des ajouts de 5 µL de 1 mM ATP, 1 mM CATR ou 1 mM BA sont réalisés grâce à des seringues Hamilton. Les variations de fluorescence observées sont exprimées en pourcentage de la fluorescence initiale de la protéine à l'aide d'un spectrofluorimètre Biologic (lampe Xe-Hg) couplé à une table traçante REC80 Servograph (Radiometer Copenhagen).

#### **II.3.14 Purification des complexes transporteur-inhibiteur pour l'étude en HDX-MS**

L'Ancp est inhibé au sein des membranes mitochondriales par incubation des mitochondries de levure (souches *ΔPOR* ou *JL1-3-ANC2ΔPOR1*) 10 minutes à 4°C dans un milieu salin composé de 20 mM MOPS, 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM EDTA, pH 6,8 supplémenté par 25 µM CATR ou 25 µM BA. Les mitochondries sont ensuite lysées à une concentration de 10 mg/mL par ajout de 1% (p/v) final de Triton X-100 en présence de 1 mM DFP et du cocktail d'antiprotéases (Roche). Le lysat mitochondrial est ensuite déposé sur une colonne d'HTP préalablement équilibrée dans un milieu contenant 20 mM MOPS, 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 0,05% Triton X-100, pH 6,8 (1 mL de résine décantée pour 2 mg de protéines mitochondriales totales). L'élution du transporteur, non retenu sur la colonne d'HTP, est contrôlée en suivant en continu l'absorption UV à 280 nm. Dans le cas d'une lyse au Triton X-100, le pic observé est dû presque totalement au détergent qui présente un pic d'absorption



dans l'UV à 276 nm et un épaulement vers 284 nm. La protéine étant éluée en même temps que le détergent, le pic observé contient aussi la protéine et sera collecté. Cette fraction collectée en sortie de colonne d'HTP est concentrée sur Amicon ULTRA-15 (30 kDa de seuil de coupure) jusqu'à la concentration voulue. Pour une expérience de marquage au deutérium, une concentration de 5 à 10 mg/mL de transporteur de levure est classiquement utilisée. Dans ces conditions, le principal contaminant est le PiC.

### II.3.15 Purification de ScAnc2p portant une étiquette polyhistidine

L'Ancp de levure fusionné à son extrémité C-terminale à une étiquette polyhistidine (noté ScAnc2p-(His₆) exprimé dans la souche JL1-3 *ANC2(His₆)*) est purifié sous forme de complexe avec le CATR comme décrit au § II.3.14 avec quelques modifications. Des mitochondries fraîchement décongelées sont préincubées pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml en présence de 20 µM CATR dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DFP et du cocktail d'antiprotéases Roche puis lysées. Après 10 min d'incubation à 4°C, la suspension est déposée sur une colonne d'HTP. La fraction non-retenue sur la colonne, qui contient le complexe transporteur étiqueté-inhibiteur, est collectée. Elle est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité IMAC sur colonne Ni-NTA (Qiagen) prééquilibrée dans un tampon constitué de 5 mM MgSO₄ (pour neutraliser l'EDTA), 50 mM Na₂HPO₄ et 0,05% (m/v) DDM, à pH 7,3. Après agitation pendant 1 h à 4°C de la suspension constituée de 100 µl de résine /mg de protéines totales mitochondriales, la résine est lavée à 4°C pendant 10 min par 12 volumes d'équivalent colonne d'un tampon constitué de 50 mM Na₂HPO₄ et 0,05% (m/v) DDM, à pH 7,3, puis la protéine est éluée par 500 mM imidazole dans 50 mM Na₂HPO₄ et 0,05% (m/v) DDM, à pH 7,3. Après élution, la fraction protéique est concentrée jusqu'à 4 mg/mL pour être ensuite analysée en SM.

### II.3.16 Digestion de ScAnc2p par des protéases acides

La mise au point de la protéolyse de l'Ancp de levure a été réalisée en accord avec les contraintes inhérentes à la technique d'HDX-MS. Les protéases sont préparées dans un tampon 20 mM Glycine, pH 2,5, et à 0°C. L'Ancp complexé au CATR ou au BA est digéré en solution dans un tampon 20 mM Glycine, pH 2,5 pendant 2 min dans un rapport protéine/protéase de 1/0,25 à 1/2 (p/p) pour la pepsine et 1/1,5 à 1/24 (p/p) pour la protéase

fongique de type XVIII recombinante (Rey *et al.*, 2009). La réaction est arrêtée par ajout de tampon de dissociation. Une aliquote est analysée par SDS-PAGE puis révélée par coloration au bleu de Coomassie et immunomarquage afin de mettre en évidence l'efficacité de protéolyse et de localiser les fragments éventuels à l'aide d'anticorps  $\alpha$ -ScAnc2p. La digestion en ligne de ScAnc2p en présence de 1M chlorure de guanidinium (GndCl) (concentration finale) est réalisée dans un bain glacé à 0°C utilisant une colonne où la pepsine est immobilisée sur une résine POROS-20AL (Rey *et al.*, 2010b).

### II.3.17 Deutération de ScAnc2p complexé à ses inhibiteurs

Le complexe ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA sont purifiés (voir § II.3.14) puis concentrés jusqu'à environ 5 mg/mL par centrifugation sur Millipore™ Amicon Ultra 30. Au temps  $T_0$ , la fraction est diluée 10 fois dans un tampon deutéré 10 mM MOPS, pH 6,8, 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 mM EDTA. Des aliquotes de 80  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ensuite prélevées à différents intervalles de temps puis diluées dans 20  $\mu\text{L}$  d'un tampon 1 M glycine pH 2,5 et enfin immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur analyse en SM

### II.3.18 Purification rapide de la porine ScVDAC1

Des mitochondries fraîchement décongelées (souche *JL1-3*) sont solubilisées à 4°C par 1% (m/v) détergents ( $\text{C}_8\text{E}_4$ ,  $\text{C}_{10}\text{E}_6$  ou HECAMEG) dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCL, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM DFP et du cocktail d'antiprotéases à pH 7,3. Après incubation pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml, la fraction mitochondriale est déposée sur une colonne d'HTP préalablement équilibrée dans un milieu contenant 10 mM Tris-HCL, 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 mM EDTA et 0,01% (m/v) détergents ( $\text{C}_8\text{E}_4$ ,  $\text{C}_{10}\text{E}_6$ ) ou 0,5% (m/v) (HECAMEG) à pH 7,3, à raison de 1 ml de support décanté pour 2 mg de protéines totales. La fraction non-retenue sur la colonne, qui contient la porine ScVDAC1, est collectée par centrifugation (1 min à 500g) ou manuellement par pression du lysat sur la colonne d'HTP à l'aide d'un piston.

### II.3.19 Purification de la porine ScVDAC1 portant une étiquette polyhistidine

Dans un premier temps, la porine de levure VDAC étiquetée à son extrémité C-terminale (ScVADC1-(His₆)) est purifiée de manière strictement identique à la porine native ScVDAC1 (**voir § II.3.18**), à l'aide de C₈E₄ ou C₁₀E₆, suivie d'une chromatographie sur colonne d'HTP. Du DDM (Calbiochem) à la concentration finale de 2% (m/v) est alors ajouté dans la fraction protéique. L'ensemble est agité pendant 30 min à 4°C, puis ScVADC1-(His₆) est purifiée par chromatographie d'affinité dans les mêmes conditions que la ScAnc2p-(His₆) (**voir § II.3.13**), si ce n'est que la fraction protéique est déposée sur la colonne Ni-NTA prééquilibrée dans un tampon dépourvu de MgSO₄ à raison de seulement 50 µL de résine/mg de protéines totales mitochondriales, que le tampon utilisé pour les lavages de la colonne contient 0,05% (m/v) de DDM, et que la protéine est éluée par 100 mM EDTA dans 40 mM Na₂HPO₄ et 0,05% (m/v) DDM, à pH 7,3.

### II.3.20 Digestion de ScVDAC1 par la pepsine

Comme pour l'Ancp, la mise au point de la protéolyse du VDAC de levure a été réalisée en accord avec les contraintes inhérentes à la technique d'HDX-MS. Les protéases sont préparé dans un tampon 20 mM Glycine, pH 2,5, et à 0°C. ScVDAC1 est digérée en solution dans un tampon 20 mM Glycine, pH 2,5 pendant 2 min dans un rapport pepsine/protéase de 1. La réaction est arrêtée par ajout de tampon de dissociation. Une aliquote est analysée par SDS-PAGE puis révélée par coloration au bleu de Coomassie. A la différence de l'Ancp, la digestion en ligne de ScVDAC1 est effectuée en absence de GndCl.

### II.3.21 Deutération du ScVDAC1

La porine ScVDAC1 est purifié (**voir § II.3.18**) puis concentré jusqu'à environ 5 mg/mL par centrifugation sur Millipore™ Amicon Ultra 30. Au temps T₀, la fraction est diluée 10 fois dans un tampon deutéré 10 mM MOPS, pH 6,8, 0.1 mM Na₂SO₄, 1 mM EDTA. Des aliquotes de 80 µL de cette solution sont ensuite prélevées à différents intervalles de temps puis diluées dans 20 µL d'un tampon 1 M glycine pH 2,5 et enfin immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur analyse en SM

## II.4 Techniques de spectrométrie de masse

### II.4.1 Solvants et matériels utilisés lors des chromatographies liquides (LC) et des analyses en SM

Trois systèmes de solvants ont été utilisés pour la chromatographie en phase liquide. Le solvant A est composé de 95% (v/v) eau (chromasolv plus pour HPLC, Sigma Aldrich), 4,9% (v/v) acétonitrile (chromasolv pour HPLC gradient grade, Sigma Aldrich) et 0,1% (v/v) acide formique (puriss. p.a. pour spectrométrie de masse, Fluka). L'éluant B correspond à un mélange de 95% acétonitrile, 4,9% (v/v) eau, 0,1% (v/v) acide formique. Enfin nous avons utilisé du dichlorométhane (puriss, stabilized with amylene, Riedel de Haën). Les matrices utilisées pour l'analyse des échantillons en spectrométrie MALDI sont l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (puriss. p.a., Sigma Aldrich) et l'acide 4-hydroxycinnamique (Sigma Aldrich) appelées plus communément acide sinapinique et  $\alpha$ -cyano, respectivement. Elles sont préparées à 10 mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile/acide trichloroacétique (50/50/0,1, v/v/v). Les pièges à protéines (Protein Macro Trap™, Michrom) et à peptides (Peptids Macro Trap™ et Peptids Micro Trap™, Michrom) sont utilisés dans la ligne de chromatographie pour dessaler les échantillons. La séparation des peptides s'effectue sur une colonne Jupiter C18 (Phenomenex) dont les particules ont un diamètre de 5  $\mu$ m.

### II.4.2 Préparation des échantillons pour le MALDI

Les échantillons à analyser sont déposés sur une plaque de MALDI puis mélangés avec 1 volume de matrice acide. Les échantillons de haut poids moléculaire (>10 kDa) sont mélangés à de l'acide sinapinique tandis que la matrice utilisée pour les peptides est de l' $\alpha$ -cyano. Les spectres de masse ont été enregistrés sur deux spectromètres MALDI-ToF, un Voyager et un Autoflex Bruker Daltonics puis analysés avec les logiciels Data Explorer (Applied Biosystems) pour le spectromètre Voyager et Flex Analysis (Bruker Daltonics) pour l'Autoflex.

### II.4.3 Montage de la ligne LC et élimination du détergent

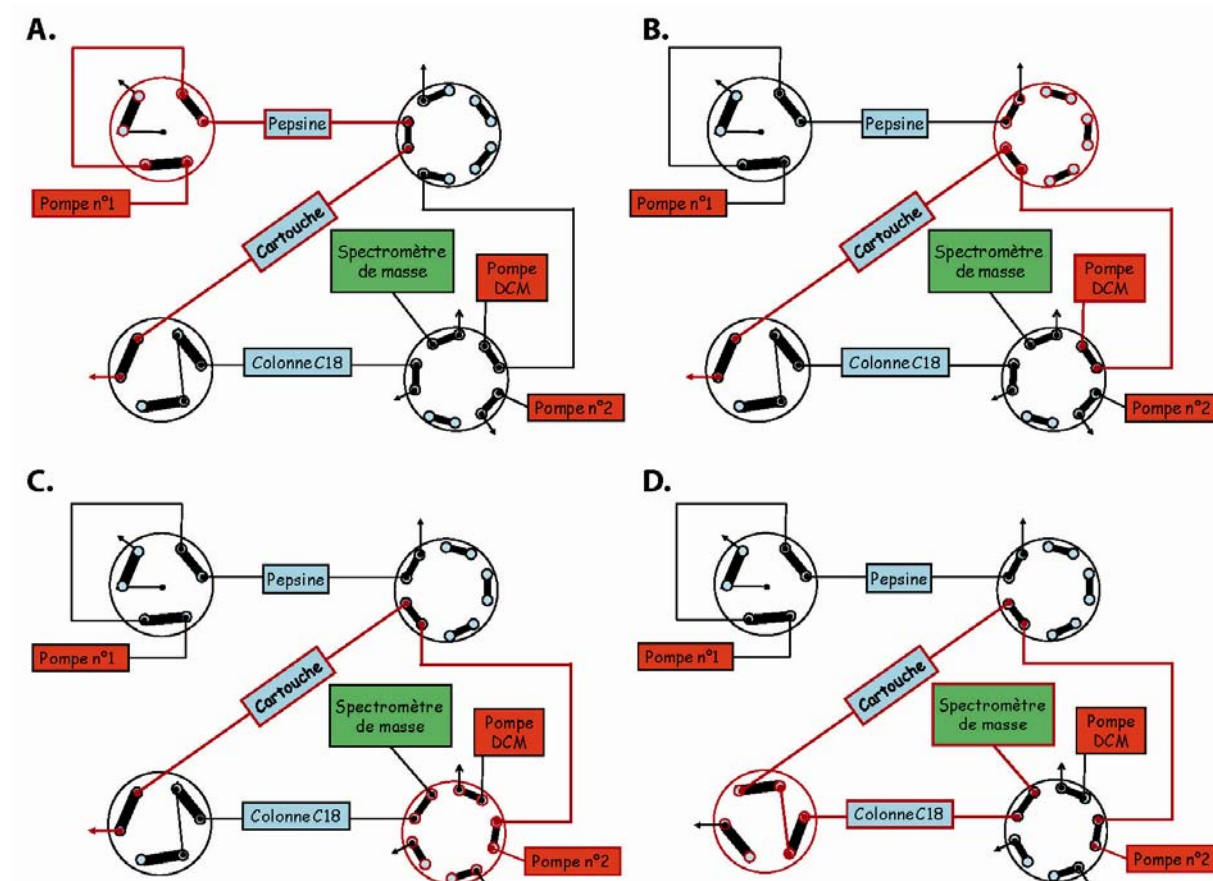
La forte sensibilité aux détergents des analyses en MS explique en grande partie pourquoi peu de protéines membranaires intégrales n'ont encore été étudiées, à ce jour par HDX-MS dans

des conditions physiologiques. L'adaptation de cette technique à l'étude du transporteur bAnc1p a permis de répondre au problème d'élimination du détergent présent dans la préparation de transporteur purifié (Rey *et al.*, 2010b). Cette approche repose sur l'élimination du détergent après protéolyse de bAnc1p en milieu acide en tirant parti de la solubilité des peptides dans un milieu aqueux sans détergent. En effet les peptides issus de la protéolyse des protéines membranaires peuvent être solubilisés sans détergent dans un mélange eau/acétonitrile et séparés selon leur hydrophobicité par LC en phase inverse. Dans l'étude des protéines solubles, les peptides produits par la digestion de la protéine d'intérêt sont fixés sur une micro colonne hydrophobe (Peptid-Trap, Michrom) et la préparation est ensuite dessalée par lavage à l'eau en milieu acide. Les peptides sont alors élués et séparés par chromatographie en phase inverse avant leur analyse en MS (LC-MS). Dans le cas de l'étude de protéines membranaires, la présence de détergent est nécessaire jusqu'à l'étape de protéolyse afin de maintenir la protéine en solution. Cependant, le détergent doit être éliminé avant l'analyse en MS afin de ne pas altérer la qualité des spectres enregistrés. Cette technique impose donc une élimination du détergent après l'étape de digestion et avant la séparation des peptides par LC, et s'effectuera juste après l'étape de dessalage. Il faut donc disposer d'un solvant capable d'extraire spécifiquement le détergent sans solubiliser les peptides : il s'agit du dichlorométhane (DCM) peu miscibles à l'eau.

L'ajout d'une étape de lavage à l'aide d'un solvant organique engendre des complications au niveau de la reproductibilité des expériences et allonge considérablement le temps de manipulation nécessaire à la préparation de l'échantillon avant son analyse en MS. De plus, l'optimisation nécessaire de l'étape de protéolyse des transporteurs mitochondriaux ou de la porine nous a contraint à mettre au point un protocole spécifique utilisant une colonne de pepsine immobilisée (Rey *et al.*, 2010a). Afin de palier le problème de protéolyse et de limiter le temps nécessaire aux étapes de lavages qui pourraient entraîner une perte d'information par contre-échange, une ligne LC compatible avec l'utilisation de DCM et intégrant une colonne de protéase immobilisée a été conçue selon le schéma présenté dans la **Figure II.3**.

Le montage comprend 4 vannes Rheodyne ou Valco, dont une est destinée à l'injection. Le système a été conçu de telle sorte qu'il protège la colonne de protéase des solvants organiques et évite la re-contamination de la cartouche, servant à piéger les peptides, par du détergent une fois celle-ci lavée par le DCM. L'automatisation et la reproductibilité des lavages ont permis de réduire leurs durées. Les temps et les débits minimums nécessaires à l'obtention d'un lavage compatible avec l'analyse en MS ont pu être définis et correspondent à ceux utilisés dans les expériences présentées par la suite. La séquence utilisée est la suivante : la colonne de protéase

et la cartouche sont équilibrées dans de l'éluant A, tandis que la colonne de séparation C18 est équilibrée à 15% (v/v) dans l'éluant B. Une fois la boucle d'injection chargée, le contenu est injecté sur la colonne de protéase et les peptides générés sont piégés sur la cartouche sous un flux de A à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  (ScAnc2p) ou à 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  (ScVDAC1) maintenu par la pompe n°1 pendant 1 minute (**Figure II.3A**). La cartouche est alors déconnectée de la colonne de protéase



**Figure II.3 : Montage de la ligne de LC pour son utilisation en DXMS.**

Les tuyaux en PEEK (traits noirs) relient les différentes pompes (pompe DCM, pompe 1 ou 2) aux différentes colonnes (colonne de séparation (C18), piège à peptides (cartouche) et colonne de protéase (Pepsine) en les connectant à des ports (cercles bleus) à travers des vannes (cercles noirs). Le flux important est représenté en rouge ainsi que la vanne actionnée pour passer à une nouvelle étape. (A). Etape de protéolyse. (B). Etape d'extraction du détergent par le DCM. (C). Etape de chasse du solvant résiduel. (D). Etape de chromatographie d'analyse des peptides.

et lavée par un flux de DCM à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 1 min 30 sec (**Figure II.3B**). La pompe n°2 prend ensuite le relai pour chasser le solvant de la cartouche en délivrant 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  de A pendant 1 min 30 sec (**Figure II.3C**). Pendant toutes ces étapes de digestion et de lavages, le flux sortant de la cartouche est éliminé. L'élution des peptides et leur séparation avant analyse en ESI-MS est réalisée par un gradient linéaire d'un mélange des éluants A et B allant de 15% à 40% (v/v) de l'éluant B en 25 minutes suivi par 5 minutes à 40% (v/v) de l'éluant B à 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  (**Figure II.3D**).

#### II.4.4 Expérience de LC-MSMS

Le séquençage des peptides issus de la protéolyse de l'Ancp, du PiC ou du VDAC été réalisé sur une ESI-trap Esquire 3000+ (Bruker Daltonics), après dessalage et extraction du détergent sur phase solide (Macro-Trap™) selon la méthode décrite ci-dessus. Les peptides sont élués de la Macro-Trap™ par un gradient d'acétonitrile allant de 85/15 (v/v) A/B à 60/40 (v/v) A/B en 60 minutes puis séparés sur une colonne Jupiter C18. Les données sont enregistrées entre les valeurs de masses sur charge ( $m/z$ ) 150 et 1600.

#### II.4.5 Analyse par LC-MS

##### II.4.5.1 Protéine entière

L'analyse de la masse des peptides contenues dans un échantillon a été réalisée sur un spectromètre de masse ESI-ToF (Time-of-flight LC/MS 6210, Agilent Technologies) après dessalage (cartouche Protein Macro Trap™) et élution par le mélange 30/70 (v/v) A/B. Le spectre a été enregistré entre 400 et 1600  $m/z$  via le logiciel Data Acquisition (Agilent) et les données déconvoluées par le programme Qualitative Analysis (Agilent) entre 10000 et 50000Da.

#### **II.4.5.2 Protéine digérée**

L'analyse de la masse des peptides a été réalisée sur un spectromètre de masse ESI-ToF (Time-of-flight LC/MS 6210, Agilent Technologies) après dessalage et extraction du détergent sur phase solide (Peptid Micro-Trap™) selon la méthode décrite dans le § II.4.3. Les peptides issus de la digestion de la protéine à analyser sont élués de la Micro-Trap™ par un gradient d'acetonitrile allant de 85/15 (v/v) A/B à 60/40 (v/v) A/B en 25 minutes et séparés sur une colonne Jupiter C18 (Phenomenex).

#### **II.4.6 Analyse de la deutération des peptides**

La moyenne des spectres de masse correspondant à un peptide donné est calculée *via* le logiciel de traitement de spectre du constructeur : Qualitative Analysis (Agilent) puis extraite sous forme d'un fichier de données binaires. Après reformatage des données, le spectre est déconvolué par le logiciel Magtran[©] 1.03 b2 (Amgen Inc.) et la masse moyenne de l'enveloppe isotopique est calculée pour le peptide d'intérêt.





# Partie III

## Résultats

### Sommaire

---

#### **III.1 Les transporteurs d'ADP/ATP (ScAnc2p) et de phosphate (PiC) : Etudes**

<b>conformationnelles et fonctionnelles.....</b>	<b>107</b>
III.1.1 Article 1 .....	107
A. Résumé .....	107
B. Résultats complémentaires non publiés.....	119
B.1 Les transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter présente en solution une dynamique conformationnelle similaires vis-à-vis de ligands .....	119
B.2 Titration des sites BA par le 3'- <i>O</i> -naphtoyl-ADP (N-ADP) .....	120
B.3 Une délétion de l'extrémité C-terminale modifie négativement l'affinité apparente d'Anc2p pour le N-ADP .....	121
B.4 Propriétés phénotypique de la souche W316.....	122
III.1.2 Article 2 .....	123
A. Résumé .....	123
B. Résultats non publiées .....	157
B.1 L'accessibilité au solvant du transporteur PiC est insensible au CATR et au BA.....	157

B.2 Premier résultats sur l'accessibilité au solvant du transporteur PiC en HDX-MS .....	160
<b>III.2 La porine de Levure VDAC (ScVDAC1) : Etude <i>in vitro</i> de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse .</b>	<b>165</b>
III.2.1 Purification de la porine ScVDAC1 dans des conditions compatibles avec son étude en HDX-MS.....	165
III.2.1.1 Détermination de la masse précise de ScVDAC1 .....	165
III.2.1.2 Mise aux points des conditions optimales d'extraction et de purification de la porine ScVDAC1 .....	167
III.2.1.3 Dosage de l'ergostérol dans les fractions de porine ScVDAC1 purifiée .	170
III.2.1.4 Détermination des conditions de protéolyse de la porine ScVDAC1p ....	170
III.2.1.5 Criblage de nouveaux détergents compatibles avec l'analyse en HDX-MS .....	171
III.2.2 Etude de la porine SCVDAC1 en HDX-MS .....	173
III.2.2.1 Carte peptidique de la porine ScVDAC1 purifiée en C ₈ E ₄ ou C ₁₀ E ₆ .....	173
III.2.2.2 Analyse de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 en HDX-MS .....	178

---

## III.1 Les transporteurs d'ADP/ATP (ScAnc2p) et de phosphate (PiC) : Etudes conformationnelles et fonctionnelles

### III.1.1. Article 1

#### Structure-function relationships of the C-terminal end of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2

**Benjamin Cléménçon**, Martial Rey, Anne-Christine Dianoux, Véronique Trézéguet, Guy J.-M. Lauquin, Gérard Brandolin and Ludovic Pelosi

*Journal of Biological Chemistry*, **283**, 11218-11225, (2008)

#### A. Résumé

La découverte puis la caractérisation du transporteur d'ADP/ATP (Ancp) sont liées à la connaissance d'inhibiteurs spécifiques naturels appartenant à deux familles : les atractylosides (ATR) et son précurseur biologique *in vivo*, le carboxyatractyloside (CATR), et l'acide bongkréique (BA), de structure totalement différente (**Figure I.10**). Il a été établi que les inhibiteurs du transport, le CATR et le BA, reconnaissent des conformations préexistantes du transporteur, appelées communément dans la littérature « conformation CATR » et « conformation BA ». Les deux inhibiteurs figent le transporteur dans des conformations distinctes, stables, représentant des états extrêmes que le transporteur adopte au cours du processus de translocation de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane mitochondriale (pour revue : (Klingenberg, 2008)). Cette situation privilégiée permet d'appréhender le mécanisme du transport par l'étude des complexes stabilisés Transporteur-CATR et transporteur-BA. La structure 3D du complexe transporteur-CATR bovin a été résolue dans notre laboratoire en collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Elle décrit une cavité probablement impliquée dans le mécanisme du transport. Malgré cette avancée, de nombreuses questions restent sans réponse. En l'occurrence, peu de données

biochimiques sont actuellement disponibles sur le transporteur au cours du mécanisme moléculaire de translocation des nucléotides à travers la membrane interne mitochondriale. Il a cependant été montré sur des mitochondries de cœur de bœuf, qu'une unité fonctionnelle du transport comporte, en particulier sur sa face intermembranaire, deux sites distincts de liaison à l'ADP : l'un de haute affinité ( $K_{d1} = 4\mu\text{M}$ ) et l'autre de basse affinité ( $K_{d2} = 65\mu\text{M}$ ) (Block et Vignais, 1984). Par ailleurs, une technique de photomarquage utilisant des analogues non transportables de l'ADP, tels que le 2-azido-[ $^{32}\text{P}$ ]-ADP (2-N₃-ADP) ou le 2-azido-3'-O-naphthoyl-[ $^{32}\text{P}$ ]-ADP (2-N₃-N-ADP), a permis d'identifier des parties de la protéine susceptibles de fixer l'ADP. Les résultats obtenus sur le modèle bovin ont montré l'existence de deux régions peptidiques, l'une dans la partie centrale de la protéine (peptide C159-M200) et une autre située dans la partie C-terminale au niveau de la dernière hélice (peptide Y250-M281) (Dalbon *et al.*, 1988). Dans le cas de l'isoforme 2 du transporteur de *S. cerevisiae* (noté Anc2p dans l'article), deux parties peptidiques distinctes similaires à celles trouvées chez le bovin, et toute fois plus restreintes, ont également été identifiées (Dianoux *et al.*, 2000). Il s'agit du peptide S182-R190 localisé, d'après la structure bovine, dans la boucle m2 constituant le fond de la cavité (**Figure I.15**). Le deuxième peptide I310-K317 correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine qui est localisée probablement hors de la cavité et exposée à l'espace intermembranaire. L'implication fonctionnelle de la boucle m2 de Anc2p dans le mécanisme moléculaire du transport des nucléotides a précédemment été investiguée dans notre laboratoire (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). En effet, son accessibilité à la trypsine et à des réactifs fluorescents de thiols dépend de l'état conformationnel adopté par le transporteur en présence de CATR ou de BA suggérant un rôle de la boucle m2 dans le passage des nucléotides à travers la cavité.

Le travail que j'ai mené s'inscrit dans la suite de ce projet, c'est-à-dire, la caractérisation fonctionnelle de l'extrémité C-terminale du transporteur Anc2p à l'aide de techniques biochimiques et de biologie moléculaire. Afin de déterminer la relation structure-fonction de l'extrémité C-terminale durant le transport de l'ADP et de l'ATP, deux approches indépendantes ont été investiguées. Dans la première, les huit derniers acides aminés d'Anc2p ont été supprimés donnant la protéine mutante Anc2p $\Delta$ Cter. Nous avons pu montrer que cette région joue un rôle essentiel dans la croissance des levures sur un milieu non fermentescible. Les résultats montrent une diminution chez Anc2p $\Delta$ Cter des propriétés de fixation des nucléotides avec la conversion des sites de fixation de l'ADP de haute en basse affinité. Dans une seconde partie, les changements conformationnels de l'extrémité C-terminale d'Anc2p induits par la présence de ligands ont été explorés de deux façon différentes : i/ en évaluant son accessibilité *in organello* par des anticorps anti-extrémité-C-terminale, et ii/ par mesure des changements de fluorescence

intrinsèque d'un mutant d'Anc2p contenant seulement un seul et unique résidu tryptophane à son extrémité C-terminale (Anc2p3Y-W316). Il a été montré que la région C-terminale n'est plus accessible à l'anticorps lorsqu'Anc2p lie des analogues non transportable de l'ADP. De plus, les changements de fluorescence intrinsèque mesurés avec Anc2p3Y-W316 en présence de différents ligands (ADP, CATR et BA) suggèrent des modifications de l'état conformationnel de l'extrémité C-terminale du transporteur. L'ensemble des résultats souligne le rôle de cette région d'Anc2p dans la reconnaissance, la fixation et le transport des nucléotides.

En conclusion, l'étude comparative des souches exprimant la protéine sauvage Anc2p ou cette même protéine dépourvue de son extrémité C-terminale a permis de confirmer les résultats obtenus par Dianoux et *al.*, (2000) et montre sans équivoque l'importance de cette région protéique dans la fixation de l'ADP et plus généralement dans le transport des nucléotides à travers la membrane interne mitochondriale. Par exemple, nous avons pu montrer que la protéine Anc2p, tout comme le transporteur bovin Anc1p, présente des sites de fixation de l'ADP de hautes et de faibles affinités. A l'inverse, un mutant d'Anc2p dépourvu de sa partie C-terminale est caractérisé par une seule et unique famille de site de faible affinité. Le passage d'une famille de sites à une autre semble donc être induit par la présence de cette partie de la protéine *via* probablement des mouvements moléculaires.

## **Article 1:**

**Structure-function relationships of the C-terminal end  
of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier  
isoform 2**

# Structure-Function Relationships of the C-Terminal End of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP Carrier Isoform 2*

Received for publication, November 21, 2007, and in revised form, February 21, 2008 Published, JBC Papers in Press, February 25, 2008, DOI 10.1074/jbc.M709565200

Benjamin Cléménçon^{‡1}, Martial Rey^{‡2}, Anne-Christine Dianoux[‡], Véronique Trézéguet[§], Guy J.-M. Lauquin[§], Gérard Brandolin[‡], and Ludovic Pelosi^{‡3}

From the [‡]Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant, UMR 5092 CNRS-Commissariat à l'Energie Atomique-Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble cedex 9, France and [§]Laboratoire de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 5095 CNRS-Université Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, F-33077 Bordeaux cedex, France

The adenine nucleotide carrier (Ancp) catalyzes the transport of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane, thus playing an essential role in the cellular energy metabolism. Two regions of Anc2p from *Saccharomyces cerevisiae* are specifically photolabeled using a photoactivable ADP derivative; they are the central matrix loop, m2, and the C-terminal end. To get more insights into the structure-function relationships of the C-terminal region during nucleotide transport, we have developed two independent approaches. In the first we have deleted the last eight amino acids of Anc2p (Anc2p $\Delta$ Cter) and demonstrated that the C-terminal end of Anc2p plays an essential role in yeast growth on a non-fermentable carbon source. This resulted from impaired nucleotide binding properties of the Anc2p $\Delta$ Cter variant in line with conversion of ADP binding sites from high to low affinity. In the second we probed the ligand-induced conformational changes of Anc2p C-terminal end (i) by assessing its accessibility to anti-C-terminal antibodies and (ii) by measuring intrinsic fluorescence changes of an Anc2p mutant containing only one tryptophan residue located at its C-terminal end (Anc2p3Y-u). We show that the C-terminal region is no further accessible to antibodies when Anc2p binds non-transportable analogues of ADP. Besides, Trp-316 fluorescence is highly increased upon ligand binding, suggesting large conformational changes. Taken together, our results highlight the involvement of the Anc2p C-terminal region in nucleotide recognition, binding, and transport.

The adenine nucleotide carrier (Ancp) is a nuclear-encoded protein located in the inner mitochondrial membrane that catalyzes the transmembrane exchange of ADP and ATP between the cytosolic and the matrix compartments (1). ADP/ATP transport is achieved by interconversion of Ancp between two conformational states that are fixed by the specific transport

inhibitors carboxyatractyloside (CATR)⁴ and bongkreic acid (BA). These conformations, referred to as CATR and BA conformations, respectively, are characterized by different reactivities of well defined regions of the protein to chemical, enzymatic, and immunochemical reagents (1). Transition between the two conformations is very slow in the absence of transportable nucleotides but is markedly accelerated in the presence of ATP and ADP. Substrate- and inhibitor-dependent conformational changes have been observed not only with the membrane-bound ADP/ATP carrier but also with the detergent-isolated carrier (1). These results suggest that the nucleotide-induced conformational changes of the isolated Ancp are similar to those occurring in the membrane-bound carrier during ADP/ATP transport (1).

The beef Anc1p (Banc1p) crystallized as the CATR-carrier complex is the only mitochondrial carrier for which high resolution structural data have been obtained (2). The 2.2-Å resolution model of the CATR conformation described six tilted transmembrane  $\alpha$ -helices that form a wide cavity opening toward the intermembrane space. The CATR molecule is located in the cavity and strongly interacts with the peptidic chain of the carrier. At the bottom of the cavity a cationic cluster of arginines and lysines residues would contribute to the nucleotide translocation mechanism (2). Photolabeling of the ADP/ATP carrier substrate binding sites has been carried out with azido derivatives of ADP/ATP, and similar results were reported using different photoprobes and mitochondria from different sources (3, 4). Two distinct peptidic regions of Banc1p were specifically labeled by 2-azido- $[\alpha$ -³²P]ADP (3). The first corresponded to a central domain (peptide Phe-153–Met-200) comprising residues from matrix loop m2 to helix H4. The second was located in the C-terminal region of the carrier (peptide Tyr-250–Met-281) including residues from matrix loop m3 to helix H6. Two shortest distinct segments of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier were also labeled by 2-azido-3'-O-naphthoyl- $[\beta$ -³²P]ADP and identified (Fig. 1A), with peptide Ser-182–Arg-190 and peptide Ile-310–Lys-317 belonging to the central part of the ADP/ATP carrier (matrix loop m2)

* This work was supported in part by grants from the Université Joseph Fourier, the CNRS, and the Commissariat à l'Energie Atomique. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a fellowship from the Région Rhône-Alpes.

² Supported by a fellowship from the Université Joseph Fourier.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-438783476; Fax: 33-4-38-78-51-85; E-mail: ludovic.pelosi@cea.fr.

⁴ The abbreviations used are: CATR, C-carboxyatractyloside; ATR, atractyloside; BA, bongkreic acid; N-ADP, 3'-O-naphthoyl-ADP; VDAC, voltage dependent anion channel; Banc1p, beef Anc1p; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MOPS, 4-morpholinopropanesulfonic acid.



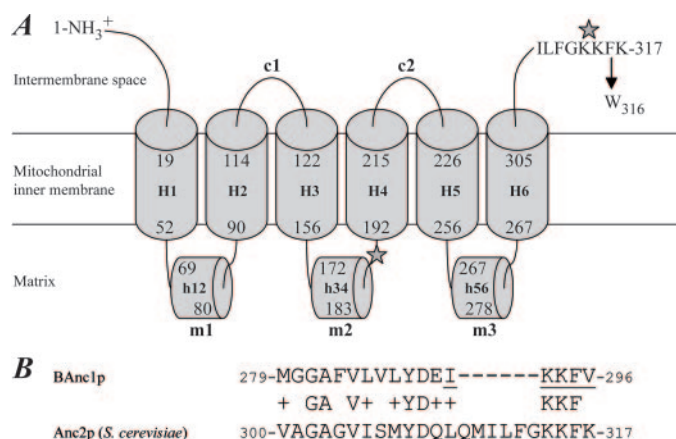


FIGURE 1. *A*, schematic representation of the postulated arrangement of *S. cerevisiae* Anc2p in the mitochondrial inner membrane. This model is based on the crystal structure of the bovine heart ADP/ATP carrier, BAnc1p (2), and on the sequence alignment of BAnc1p and *S. cerevisiae* Anc2p performed with ClustalW software. Residues located at ends of helices are numbered, taking into account the sequence of Anc2p starting at Ser1. Boxes represent transmembrane and matrix-exposed helices. Transmembrane helices (H1 to H6) are connected by either cytosolic loops (c1 and c2) or matrix loops (m1, m2, and m3). Matrix helices (h12 to h56) are also represented. Gray stars indicate the two peptide region (182–190 and 310–317) photolabeled by 2-azido-3'-O-naphthoyl-[ $\beta$ -³²P]ADP (4). The amino acid sequence corresponding to the peptide 310–317 is detailed. It is deleted in the Anc2p $\Delta$ Cter mutant. A black arrow shows the position of the Phe residue mutated into a Trp residue in the Anc2p3Y-W316 variant. *B*, alignment of the C-terminal end amino acid sequences of BAnc1p and *S. cerevisiae* Anc2p. For sequences alignment, ClustalW software was used with default parameters. (+) denotes similar residues. Conserved residues are indicated between the two sequences. Underlined residues in BAnc1p sequence are not identified in the crystal structure.

and its C-terminal end, respectively (4). Plausible models in which the two distinct regions would be involved in organization of the nucleotide binding site(s) were proposed assuming the carrier is a dimer (3, 4). However, it was recently shown that the yeast Ancp might be organized as a monomer in mitochondrial membranes and in detergent solution (5–7), suggesting that the two photolabeled regions would belong to the same monomer. Nevertheless, this hypothesis cannot accommodate the previous findings that one molecule of CATR or BA binds with high affinity to a carrier dimer, consistent with a multimeric organization of the carrier (8, 9).

The experiments described in this paper were carried out with the *Saccharomyces cerevisiae* Anc2p isoform of the ADP/ATP carrier. We have investigated the functional role of Anc2p C-terminal end using two different approaches. The first one was based on expression and biochemical characterization of a mutant of Anc2p of which we deleted the last eight amino acids (Anc2p $\Delta$ Cter) (Fig. 1A). In the second approach we probed the ligand-induced conformational changes of the C-terminal end of Anc2p by ELISA and measurements of intrinsic fluorescence changes of an Anc2p variant containing only one tryptophan residue at its C-terminal end (Fig. 1A). Taken together, our results highlight for the first time the involvement of the Anc2p C-terminal region in nucleotide recognition, binding, and transport. Our results are discussed in terms of participation of the C-terminal region in the nucleotide transport process and in the putative oligomerization state of the carrier.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals**—BA and [³H]atractyloside ([³H]ATR) were prepared as previously described (10, 11). The 3'-O-naphthoyl-ADP (N-ADP), 3'-O-naphthoyl-AMP, and 2'(3')-O-(2,3,6-trinitrophenyl)-ADP were synthesized as described in Block *et al.* (12), Schlimme *et al.* (13), and Mayer *et al.* (14), respectively. The 8-Br-ADP was from Sigma. [8-¹⁴C]ADP (60 mCi/mmol) was from PerkinElmer Life Sciences. The polyclonal antibodies used in this work were generated in rabbits against yeast SDS-treated voltage-dependent anion channel (VDAC) or against a 14-residue peptide corresponding to the C-terminal end sequence of Anc2p (YDQLQMILFGKKFK) or against hydroxylapatite-purified Anc2p treated with SDS.

**Bacterial and Yeast Strains and Media**—The *Escherichia coli* strain used in this work was JM109: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r_K*, *m_K*⁺), *relA1*, *supE44*, D(*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI^qZAM15*] (Promega). The bacterial strain was grown on LB medium (Difco) supplemented with 100  $\mu$ g/ml ampicillin when necessary. Bacteria were transformed according to standard classic methods using CaCl₂ (15). The following *S. cerevisiae* strains were used in this study: W303-1B (Mata *leu2-3,112 his3-11 ade2-1 trp1-1 ura3-1*) and its derivative JL-1-3 (W303-1B *anc1::LEU2 anc2::HIS3 anc3::URA3*) (16) and JL-1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u[−] (JL-1-3  $\Delta$ *anc2::HIS3*  $\Delta$ [269–975]*anc3*) (33). Yeast cells were grown at 28 °C on media containing 2% (w/v) bactopectone (Difco), 1% (w/v) yeast extract (Difco) supplemented with 2% (w/v) lactic acid and 1% (w/v) K₂HPO₄ pH 5.5 (YPL). A selective synthetic minimal medium lacking Trp (Bio 101) supplemented with 2% (w/v) glucose (YNB Glc W[−]) was used when indicated.

**Construction of the Mutated *anc2* Genes**—Oligonucleotide-directed mutagenesis of the *ANC2* gene was performed using the standard QuikChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene to delete the 3' end of the gene or to introduce a Trp residue at position 316. The pMD101 plasmid (TRP1/CEN6/ARSH4)-containing *ANC2* gene, coding for Anc2p, and its 3'- and 5'-flanking regions (between PstI and SalI restriction sites) was derived from pRS314 and was previously described (17). Deletion of the last eight codons (from position +931 to +954, position +1 corresponding to A from the ATG codon) corresponding to the C-terminal end of Anc2p was obtained by PCR using the pMD101 plasmid as a template and the primers 5'-CAATGTACGACCAACTGCAAATGTAAGTCTAATC-TGGCTTGATTC-3' and 5'-GAATCAAGCCAGATTAGAC-TTACATTTGCAGTTGGTCGTACATTG-3'. The corresponding plasmid obtained was called pMD-ANC2 $\Delta$ Cter. Two mutations at position +950 and +951 (Phe codon replaced with Trp codon) were introduced by PCR using the recombinant plasmid pMDANC2-- $\Delta$ W (derived from pMD101) coding for a Trp-less variant of Anc2p (17) as a template and the primers 5'-GATCTTGTGTTGGTAAGAAGTGGAAATAAGACT-AATCTGGCT-3' and 5'-AGCCAGATTAGTCTTATTTCC-ACTTCTTACCAAACAAGATC-3'. The resulting plasmid was named pMDANC2-3Y-W316. *ANC2* open reading frame (ORF), mutated or not, were controlled by DNA sequencing (Genome Express) of plasmids pMD101 (wild type) pMD-ANC2- $\Delta$ Cter, pMDANC2- $\Delta$ W, and pMDANC2-3Y-W316

(mutated ORF), which were then used to transform the JL1Δ2Δ3u[−] strain according to the LiCl procedure (18). Transformants were selected, and yeast strains were named *K317* (wild-type *ANC2*), *M309*, *K317-ΔW*, and *W316*, respectively.

**Isolation of Mitochondria**—Yeast cells grown on YPL were harvested in the late log phase ( $A_{600\text{ nm}}$  near 5). Mitochondria were prepared as previously described (19).

**Binding Assays**—Specific binding of [¹⁴C]ADP or [³H]ATR to the ADP/ATP carrier in mitochondria was assessed by the CATR chase procedures (20). Incubation was 30 min for [³H]ATR to 2 h for [¹⁴C]ADP at 4 °C. The  $K_d$  values and the total number of ligand-binding sites were calculated from Scatchard plot of the data. When Scatchard plot were curvilinear, they were arbitrarily fitted using Kaleidagraph 4.0 according to a model with two classes of an equal number of interacting binding sites (21) with high affinity ( $K_{d1}$ ) and low affinity constants ( $K_{d2}$ ). The number of bound ligands ( $N_B$ ) is related to the total number of sites ( $S$ ),  $N_F$  (the number of free ligands),  $K_{d1}$ , and  $K_{d2}$  by the Adair equation,

$$N_B = \frac{S \left( \frac{N_F/K_{d1} + 2N_F^2/K_{d1} \times K_{d2}}{1 + N_F/K_{d1} + 2N_F^2/K_{d1} \times K_{d2}} \right)}{2} \quad (\text{Eq. 1})$$

**ADP/ATP Transport Assay in Isolated Mitochondria**—ADP/ATP transport was measured by means of a luminescence assay as described in Passarella *et al.* (22). Freshly prepared mitochondria were incubated at 25 °C in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM KH₂PO₄, 0.6 M mannitol, 0.1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 10 μM Ap5A (an inhibitor of adenylate kinase), and 1 mM α-ketoglutarate (as respiratory substrate) in the presence of 0.1% (w/v) luciferin and 0.1% (w/v) luciferase (19).

**Isolation of the ADP/ATP Carriers**—The ADP/ATP carrier protein from yeast mitochondria was isolated by chromatography on hydroxylapatite (Bio-Rad) following the method described in Brandolin *et al.* (23). The final carrier protein concentration in the purified fraction ranged between 0.03 and 0.05 mg/ml.

**Fluorescence Assays**—Fluorescence assays were carried out with a high sensitivity spectrofluorometer (Biologic, Grenoble, France). Samples were introduced in a 1 × 1-cm fluorescence quartz cuvette inserted in a temperature-controlled cell holder with continuous stirring. Routinely, the carrier preparation in 0.5 ml was diluted with 1.5 ml of 136 mM glycerol. Reagents were injected with Hamilton automatic syringes in small volumes (2–10 μl). Fluorescence of the tryptophan residues was excited at 300 nm (1-nm band-pass) with a 150-watt xenon lamp. The emitted light was measured at right angles through a 0-54 Corning filter, the band-pass being centered at 297 nm. The temperature was set at 10 °C.

**SDS-PAGE and Western Blotting**—The protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Sigma) and bovine serum albumin as a standard. For SDS-PAGE, samples were prepared as described in (19). Antibodies were used at the following dilutions: anti-C-terminal peptide of Anc2p, 1/3000; anti-SDS-treated Anc2p, 1/5000; anti-SDS-treated VDAC, 1/2000. Immunodetection was performed using horseradish peroxidase-coupled protein A and the ECL-enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences).

**Immunoreactivity Assays**—The ability of anti-C-terminal antiserum to react with the membrane-bound carrier incubated with or without ligands was tested by ELISA, as previously described (24). Freeze-thawed mitochondria were suspended in 10 mM MOPS-NaOH, pH 6.5, containing 0.12 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM diisopropyl fluorophosphate, and Complete mini-EDTA-free anti-proteases (according to supplier instructions). Because of the lower affinity of the carrier for nucleotides as compared with that for inhibitors, N-ADP and ADP were present at 50 or 100 μM final concentration, respectively, during all steps of the assay.

## RESULTS

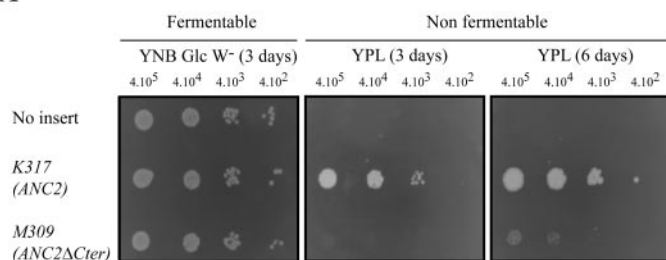
**Deletion of the Last Eight Amino Acids of Anc2p Severely Impairs Growth of Yeast Cells on Non-fermentable Carbon Source**—Photolabeling of Anc2p in mitochondria with 2-azido-3'-O-naphthoyl-[β-³²P]ADP resulted in the identification of two specifically photolabeled sites located in the central matrix loop m2 and in the C-terminal end of the carrier, respectively (4). To assess the functional role of the C-terminal region, it was deleted from Anc2p by a genetic approach. The resulting carrier protein (ANC2ΔCter) is 309-amino acids long and lacks its last eight amino acids at the C-terminal end. It has a predicted molecular weight of 33.3 kDa and is referred to as Anc2pΔCter in the following. The construct was cloned into the yeast pRS314 centromeric vector under the control of the native promoter and terminator of *ANC2* (17). The resulting plasmid, pMD-ANC2-ΔCter, and the control plasmid, pMD101 (17), were transformed in JL1Δ2Δ3u[−] strain in which the three *ANC* genes were inactivated (25) to give the resulting strains *K317* and *M309*, respectively.

The ADP/ATP transport activity of Anc2pΔCter and Anc2p expressed from the two strains was first assessed by their ability to rescue growth of JL-1Δ2Δ3u[−] on a non-fermentable carbon source (YPL) (Fig. 2). All of the strains developed similarly when plated onto a solid synthetic glucose medium lacking Trp (Fig. 2A). However, the *M309* strain grew much more slowly on solid medium than *K317* with lactate as the sole carbon source (Fig. 2A). This behavior was confirmed by examining cell growth at 28 °C in liquid YPL medium (Fig. 2B). Indeed, *M309*, exhibited a doubling time of 16 h with  $A_{600\text{ nm}} = 6$  for the saturation phase, whereas that of *K317* was 2.5 h with  $A_{600\text{ nm}} = 11$  for the saturation phase (Table 1). We, thus, concluded that the poor growth of *M309* on the non-fermentable carbon source reflects a severe impairment of the carrier functioning.

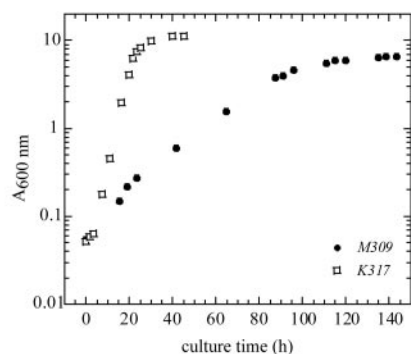
**Deletion of Anc2p C-terminal End Does Not Modify the Carrier Content in Yeast Mitochondria**—The ADP/ATP carrier contents of *K317* and *M309* mitochondrial lysates were evaluated by Western blot analyses after SDS-PAGE to check out if impairment of *M309* growth could be related to a lower Anc2p mitochondria content. VDAC was used as a control for the amount of mitochondrial proteins loaded on the gel. Both strains exhibited similar Anc2p content (Fig. 3A, lanes 1 and 2). As one could expect, Anc2pΔCter was not immunodetected by the anti-C-terminal peptide antiserum (Fig. 3A, lane 2). A more accurate determination of the carrier content was performed by binding experiments of [³H]ATR, a specific inhibitor of Ancp. As shown in Fig. 3B, binding of [³H]ATR increased as a function



A



B



**FIGURE 2. Phenotypic analyses of JL1Δ2Δ3u⁻ carrying either pMD101 (K317) or pMD-ANC2-ΔCter (M309).** A, transformants ( $4 \times 10^5$  to  $4 \times 10^2$  cells) were spotted onto YNB Glc W⁻ (fermentable carbon source) or YPL (non-fermentable) solid media. Plates were incubated under aerobiosis at 28 °C for 3 days (YNB Glc W⁻ and YPL media) or 6 days (only YPL medium). The JL1Δ2Δ3u⁻ strain transformed by pR314 vector, carrying only the promoter and terminator sequences of the *ANC2* gene, was used as a control (pR5314Δ*ANC2*). B, growth curves of strains K317 and M309 in liquid YPL-rich medium monitored by absorbance at 600 nm ( $A_{600 \text{ nm}}$ ) for 45 and 150 h, respectively. The cultures were inoculated with cells previously grown on YNB Glc W⁻ medium to obtain an initial  $A_{600 \text{ nm}} = 0.1$ . Values are the means of at least three independent experiments.

of added ligand and reached a plateau, with no significant difference between Anc2p and Anc2pΔCter.  $K_d$  values and maximum number of binding sites were calculated from the Scatchard plots (not shown) and were similar for both the variant and the wild-type carriers (Table 1). Similar results were obtained from binding experiments of [³H]BA (data not shown). Therefore, the C-terminal end is not involved in the inhibitor binding sites. Consequently, the poor M309 growth on YPL may be explained by a lower ADP/ATP exchange activity of Anc2pΔCter.

**Anc2p-ΔCter Mitochondria Are Deficient in ADP/ATP Transport Activity**—Measurements of the ADP/ATP transport of Anc2p and Anc2pΔCter were carried out on mitochondria isolated from the corresponding strains by the luciferase/luciferin system (cf. "Experimental Procedures"). As shown in Table 1, Anc2p and Anc2pΔCter exhibit very similar apparent  $V_{\text{max}}$  and  $k_{\text{cat}}$  values. In contrast, the apparent  $K_m$  of external free ADP for Anc2pΔCter was ~10 times higher than for Anc2p (Table 1). This result suggests that the C-terminal end of Anc2p could be involved in ADP binding step as already hypothesized (4).

**C-terminal End Deletion Dramatically Modifies the Affinity of Anc2p for ADP**—Specific binding of [¹⁴C]ADP to Anc2p and Anc2pΔCter in mitochondria was assessed by a differential method based on the use of CATR (20). Scatchard representation of data exhibits a curvilinear plot for Anc2p, indicating the presence of high and low affinity binding sites (Fig. 4A). The total number of binding sites for ADP ( $S_{\text{ADP}}$ ) determined by

TABLE 1

**Yeast growth properties, ligand binding data to the carriers, and kinetic parameters for ADP/ATP transport activity of mitochondria isolated from the strains K317 and M309**

Strains	K317 (Anc2p)	M309 (Anc2pΔCter)
<b>Cell culture in YPL^a</b>		
Doubling time (h)	2.5	16.0
Growth yields $A_{600 \text{ nm}}$	11	6
<b>[³H]ATR binding^b</b>		
$B_{\text{max}}$ pmol/mg of protein	$500 \pm 27$	$497 \pm 76$
$K_d$ (nM)	$220 \pm 60$	$250 \pm 30$
<b>ADP/ATP exchange^c</b>		
$V_{\text{max}}$ (nmol ATP/min/mg of protein)	$1157 \pm 447$	$950 \pm 312$
$k_{\text{cat}}$ (min ⁻¹ )	$2031 \pm 300$	$2047 \pm 410$
$K_m$ external ADP (μM)	$4 \pm 2$	$43 \pm 10$
<b>[¹⁴C]ADP binding^d</b>		
$S_{\text{ADP}}$ (pmol/mg or protein)	$631 \pm 35$	$539 \pm 77$
$K_{d1}$ (μM)	$0.60 \pm 0.07$	
$K_{d2}$ (μM)	$32 \pm 7$	
$K_{d3}$ (μM)		$21 \pm 5$

^a Growth yields and doubling times were determined from liquid cultures at 28 °C in YPL-rich medium. Growth yields correspond to the values of  $A_{600 \text{ nm}}$  measured during the stationary phase of the cultures.

^b [³H]ATR binding parameters are averaged from three independent experiments. The number of binding sites and  $K_d$  values were calculated from Scatchard plots of [³H]ATR binding data.

^c  $V_{\text{max}}$  and apparent  $K_m$  for external free ADP were calculated from kinetic data by using the Michaelis-Menten equation.  $k_{\text{cat}}$  refers to the turnover number calculated with the carrier content obtained from [³H]ATR binding experiments, assuming that 1 mol of ATR binds to 1 mol of transport unit. Values are the averages of three independent experiments.

^d [¹⁴C]ADP binding parameters are averaged from three independent experiments. The number of binding sites and  $K_d$  values were calculated from Scatchard plots of [¹⁴C]ADP binding data (M309) or from fitting with a model of two classes of interacting binding sites by the Adair's equation (K317).

^e Two classes of binding sites.

^f One class of binding sites.

extrapolation of the Scatchard plot was about 600 pmol/mg of protein, a value similar from the number of ATR binding sites (500 pmol/mg of protein, Table 1). The curvilinear Scatchard plot was fitted with a two interactive binding site model according to the Adair equation (cf. "Experimental Procedures"), leading for Anc2p to the ADP binding parameters summarized in Table 1:  $S_{\text{ADP}} = 631$  pmol/mg of protein,  $K_{d1} = 0.6$  μM, and  $K_{d2} = 32$  μM. Interestingly, a linear Scatchard plot was obtained for Anc2pΔCter, leading to  $S_{\text{ADP}} = 539$  pmol/mg of protein and a different apparent  $K_d$  value,  $K_{d3} = 21$  μM (Table 1). As in the case of Anc2p, the  $S_{\text{ADP}}$  value was in the same range as the ATR maximum number of binding sites. This indicates that the C-terminal end of the carrier does not constitute a whole binding site but participates in it. Unlike inhibitors and ADP, non-transportable nucleotide analogues modify C-terminal end reactivity toward anti-C-terminal antibodies.

There are evidences that the accessibilities of different regions of Ancp depend on its conformational state (19, 24, 26–32). However, so far no data are available about the Anc2p C-terminal end. Therefore, in a first step we assessed Anc2p C-terminal immunoreactivity in the presence of various ligands by ELISA. The antibodies were directed against a peptide corresponding to the last 14 Anc2p amino acids and were used with freeze-thawed mitochondria from strain K317 (Fig. 1). As a control, we examined the specificity of the antibodies toward mitochondria from strain M309. The results presented in Fig. 5A show that the anti-C-terminal antibodies react specifically with Anc2p in a protein concentration-dependent manner without any significant difference between mitochondria incu-

## C-terminal End of Anc2p Involved in Nucleotide Binding

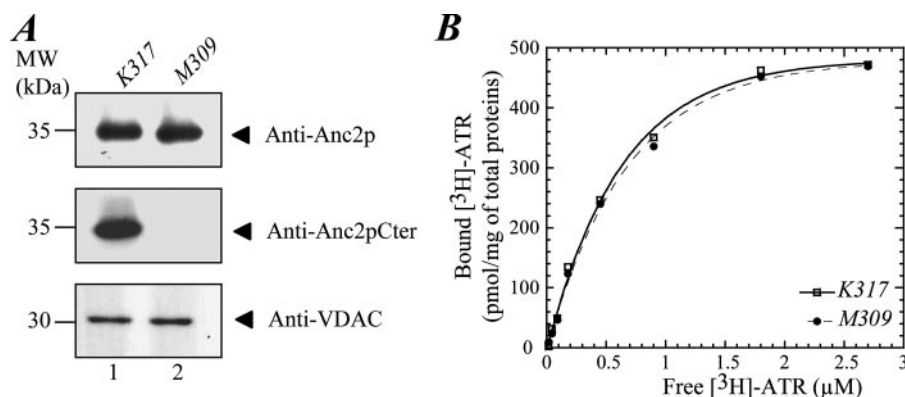


FIGURE 3. **Anc2p $\Delta$ Cter** content in mitochondria. A, mitochondrial proteins (20  $\mu$ g in each lane) prepared from strains K317 (lane 1) and M309 (lane 2) were subjected to SDS-PAGE (12.5% acrylamide) and Western blotting. Proteins were detected with polyclonal antibodies directed against a synthetic peptide corresponding to amino acids 303–317 of Anc2p or SDS-treated Anc2p. As a standard, a quantification of VDAC porin using polyclonal anti-VDAC antibodies was performed. Immune complexes were detected with ECL. Identified polypeptides are indicated by arrowheads. MW, molecular weights in kDa. B, binding of [³H]ATR to mitochondria from strains K317 and M309 analyzed in A. Mitochondria (0.1 ml, 10 mg/ml) were added to 1 ml of KCl standard medium containing increasing concentrations of [³H]ATR and incubated for 30 min at 0 °C. After centrifugation, bound [³H]ATR in the pellets was determined by scintillation counting. When present, CATR was added to a final concentration of 20  $\mu$ M.

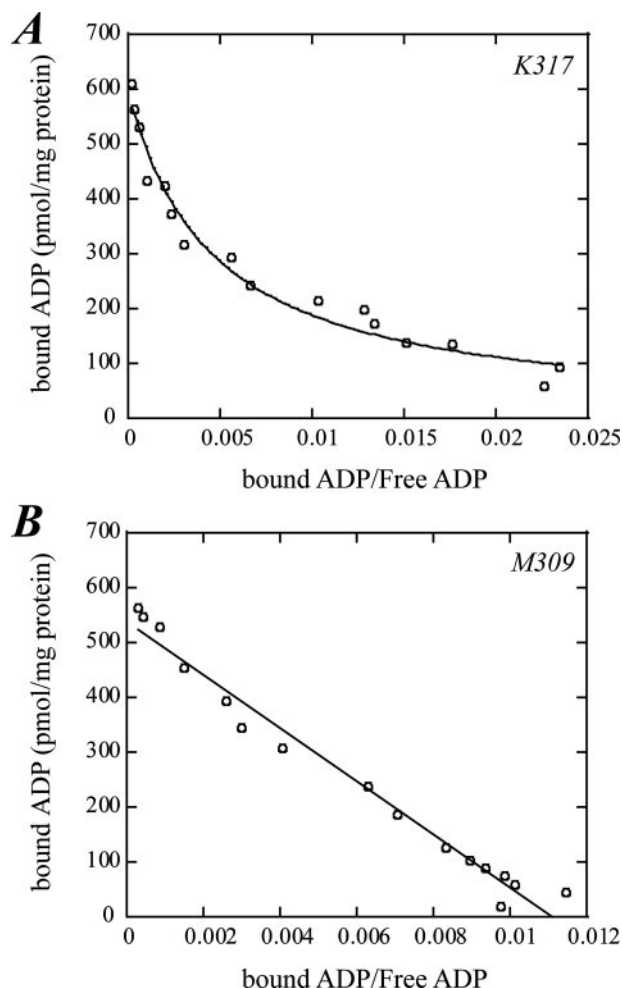


FIGURE 4. **Characterization of ADP-binding properties of Anc2p and Anc2p $\Delta$ Cter.** Binding assays were performed as described under "Experimental Procedures" with [¹⁴C]ADP added at concentrations ranging between 0.125 and 120  $\mu$ M. A, curvilinear Scatchard plots of ADP binding on mitochondria prepared from strain K317 (21). B, linear Scatchard plots of ADP binding on mitochondria prepared from strain M309. Identical plots were obtained from three independent experiments.

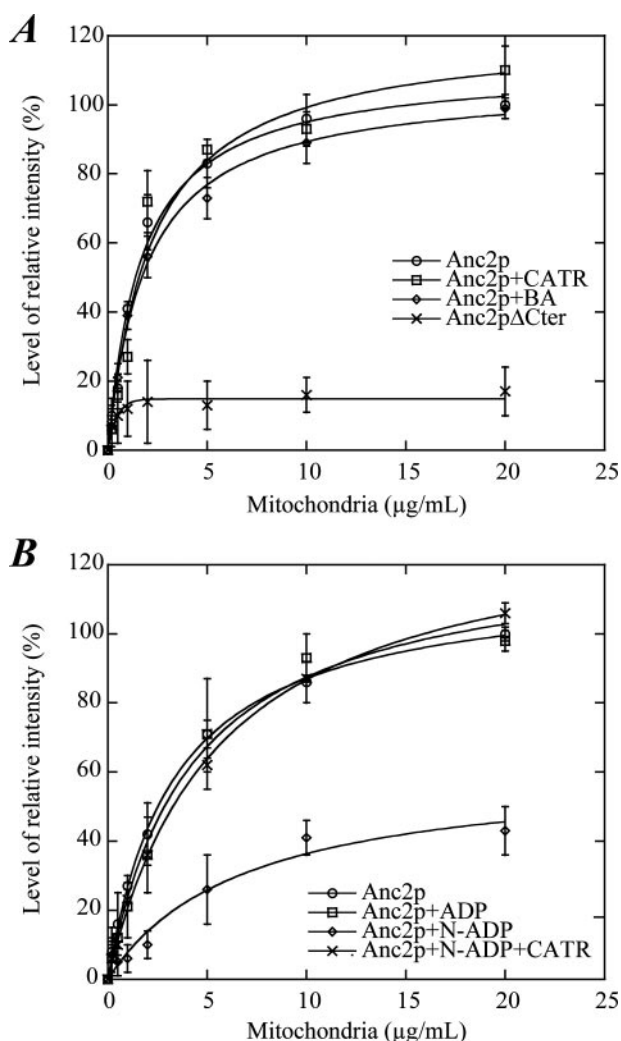
bated with or without inhibitors. Thus, accessibility of Anc2p C-terminal end to the antibodies does not depend on the CATR- or BA-induced conformations.

Similar experiments were performed in the presence of either the natural substrate ADP or the non-transportable N-ADP (12). Both ligands were used at saturating concentrations. ADP did not modify C-terminal end reactivity (Fig. 5B), whereas an inhibition of ~60–70% was observed in the presence of N-ADP in a CATR-sensitive manner (Fig. 5B). We have checked that this effect was not merely induced by the naphthoyl part of the nucleotide analogue. Indeed, no inhibition of the C-terminal reactivity toward antibodies was observed with 3'-O-

naphthoyl-AMP tested at a concentration twice higher than N-ADP (data not shown). Moreover, similar inhibitions were obtained with other non-transportable nucleotide analogues such as 2'(3')-O-(2,3,6-trinitrophenyl)-ADP or 8-Br-ADP (data not shown). Thus, the formation of a stable N-ADP-carrier complex would restrict access of the C-terminal epitope to the antibodies. This hypothesis is in line with the specific photolabeling of Anc2p C-terminal end by an N-ADP analogue, the 2-azido-3'-O-naphthoyl- $[\beta$ -³²P]ADP (4). We conclude that the N-ADP/carrier and the ADP-carrier complexes display distinct topographies at the C-terminal end.

**Trp-316 Can Probe the Ligand-induced Conformational Changes of the C-terminal Region of Anc2p**—The Anc2p isoform contains three Trp residues located at position 87, 126, and 235 in the polypeptide chain. In a previous work we replaced all the Trp residues with Tyr residues by site-directed mutagenesis (17). The Anc2p $\Delta$ W mutant was able to bind inhibitors and to catalyze the ADP/ATP exchange with properties similar to those of Anc2p (17). To probe the ligand-induced conformational changes of Anc2p C-terminal end by measuring intrinsic fluorescence changes, we substituted Phe-316 by a Trp residue in Anc2p $\Delta$ W (Fig. 1A). This was achieved by site-directed mutagenesis using the pMDANC2-3Y plasmid. The strain transformed with the resulting plasmid was named W316 (*cf.* "Experimental Procedures"). The K317- $\Delta$ W and W316 strains grew on YPL, indicating that the mutated genes encoded active ADP/ATP carriers (not shown). Both strains displayed similar growth characteristics with a doubling time of ~3 h and  $A_{600} = 11$  at the growth plateau. Moreover, the amounts of Anc2p $\Delta$ W and Anc2p3Y-W316 in the corresponding mitochondria were similar, as evaluated by Western blot analyses of mitochondrial lysates and ATR binding experiments (not shown). Thus, replacement of Phe-316 with a tryptophan residue did not impair the biochemical properties of Anc2p $\Delta$ W.

Then we examined the intrinsic fluorescence properties of the Anc2p3Y-W316 carrier purified as previously described



**FIGURE 5. Reactivity of anti-C-terminal peptide antiserum toward Anc2p as assessed by ELISA.** Mitochondrial lysates preincubated or not with ligands were coated at increasing concentrations onto microtiter plates overnight at 4 °C and then incubated with antibodies diluted to 3/10,000. Immune complexes were detected with peroxidase-conjugated protein A followed by a chromogenic reaction (see "Experimental Procedures"). Absorbance was recorded at 450 nm, and data are plotted as the percentage of the values measured with Anc2p expressed in strain K317 and used without any treatment. *A*, reactivities to anti-C-terminal peptide antiserum of Anc2p from strain K317 treated or not with either 20 μM CATR or BA. Mitochondria from strain M309 were used as a negative control. *B*, same experiment as in *A*, but mitochondria were incubated with either 100 μM ADP or 50 μM N-ADP or with 50 μM N-ADP then with 20 μM CATR as indicated.

(23). Fig. 6 shows the time-course of the ATP-induced fluorescence change of Anc2p3Y-W316, measured at 10 °C. The addition of ATP at a subsaturating concentration (5 μM) resulted in a very rapid increase of fluorescence ( $\Delta F/F = 1.9\%$ ). Upon the addition of CATR, the fluorescence decreased to a level lower than the initial level of fluorescence of the unliganded carrier ( $\Delta F/F = -0.9\%$ ). As illustrated in Fig. 6, the fluorescence signal increased with the concentration of added ATP to reach a plateau at about 8–10 μM. ADP induced a fluorescence increase similar to that obtained with ATP (not shown). When added before ATP or ADP, CATR used at saturating concentrations induced approximately a 1% decrease of the fluorescence of the carrier ( $\Delta F/F = -0.8\%$ ), and it totally prevented the ATP-induced fluorescence increase (Fig. 6). The effect of BA, which

modified intrinsic fluorescence only in the presence of ATP (or ADP), led to a large increase in fluorescence ( $\Delta F/F = 6.8\%$ ) (Fig. 6). Taken together, these results show that Trp-316 probes conformational changes of the carrier induced by ligand-binding (ADP, ATP, CATR, and BA). It remains to determine whether the fluorescence variations result from either a direct and local modification of the molecular environment of the peptide chain at the C-terminal end or a long distance reflection of global conformational changes undergone by the protein upon ligand binding and indirectly affecting this part of Anc2p.

## DISCUSSION

Anc2p C-terminal region was identified as a putative or participating to a nucleotide binding site by previous photoaffinity labeling experiments (4). Unfortunately no structural data are available so far about this region since the last five amino acids of the BAnc1p are not resolved in the three-dimension structure (2) (Fig. 1*B*). To ascertain the involvement of Anc2p C-terminal end in the carrier functioning, possibly in the early nucleotide binding steps, we first considered deleting this part of the carrier by a genetic approach.

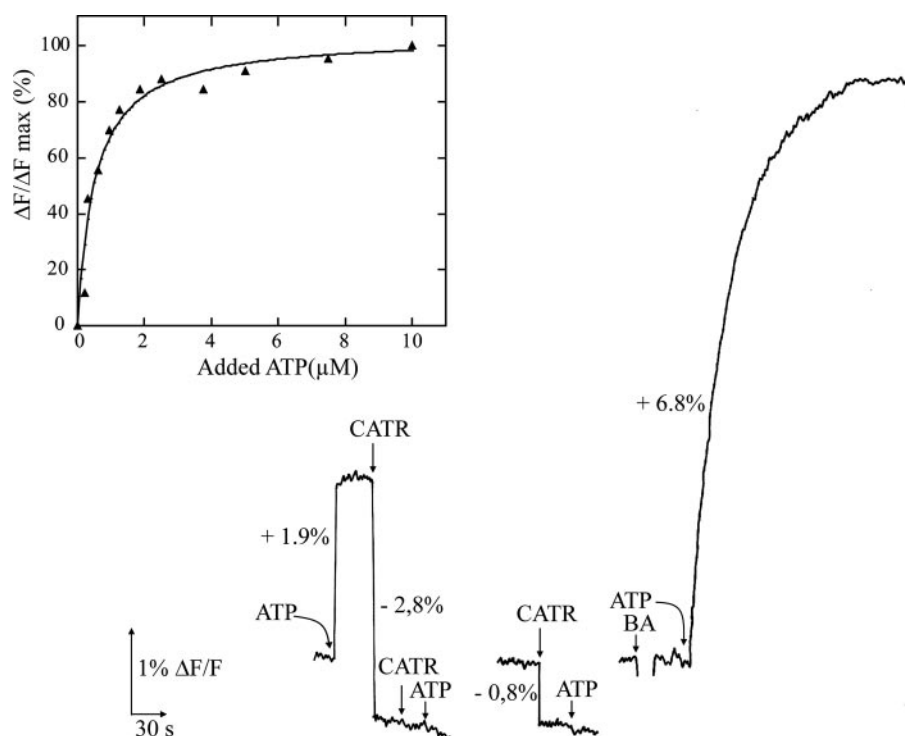
As a first result, yeast growth was severely impaired on non-fermentable carbon source, indicating a impaired Anc2p function. It was determined that Anc2pΔCter was properly imported into mitochondria and that the ATR binding properties were not modified as compared with that of the wild-type Anc2p. This suggests that although shortened, the Anc2pΔCter variant is properly folded in the mitochondrial inner membrane. We then carried out ADP/ATP transport assays with isolated mitochondria. Our results show that Anc2pΔCter exhibits  $V_{\max}$  and  $k_{\text{cat}}$  values very similar to that of Anc2p, but the apparent  $K_m$  for external free ADP is about 10 times higher for Anc2pΔCter than for Anc2p. This is the first time a role in the nucleotide transport function can be clearly assigned to the C-terminal region of Anc2p. However, considering an unchanged  $V_{\max}$  and a higher  $K_m^{\text{ADP}}$ , we can hypothesize that the Ile-310–Lys-317 peptide would not participate in the translocation process *per se* but, rather, in the productive nucleotide binding step. This is consistent with the photolabeling experiment results reported by Dianoux *et al.* (4). Two regions were photolabeled, indicating either participation of two different regions of the carrier in a nucleotide binding site or the existence of two different binding sites.

It should be pointed out that, as in the case of the yeast Anc2p, two different regions of the BAnc1p were specifically labeled with photoactivable nucleotide analogue (3). The first one corresponds roughly to the C-terminal half of the m2 matrix loop and comprises Lys-162 and -165 (Lys-179 and -182 for Anc2p). In contrast, the second one does not correspond to the protein C-terminal end but to the end of matrix loop m3 and the N-terminal region of helix H6, Val-254–Met-281 (Phe-269 and Val-296 for Anc2p). This may result from the fact that the C-terminal region of BAnc1p is shorter than that of the yeast protein (Fig. 1*B*), enlightening some differences of the bovine and the yeast ADP/ATP carriers folding (3, 4).

Involvement of the C-terminal region of Anc2p in ADP binding was confirmed from binding experiments of external ADP to isolated mitochondria. As observed previously for the mem-



## C-terminal End of Anc2p Involved in Nucleotide Binding



**FIGURE 6. Time-course of ATP, CATR, and BA-induced fluorescence changes of the detergent-isolated Anc2p3Y-W316 carrier.** The assay was carried out at 10 °C. Fluorescence emission ( $\Delta F/F$ ) was recorded at 355 nm as described under "Experimental Procedures." The protein concentration was 0.045 mg/ml. ATP, CATR, and BA were added to a final concentration of 2.5  $\mu\text{M}$ . Specific variations of intrinsic fluorescence are shown as relative fluorescence changes. *Inset*, the ATP-induced fluorescence changes (% of the signal measured in the presence of 10  $\mu\text{M}$  ATP) are plotted as a function of the concentration of added ATP.

brane-bound BAnc1p (21), the data obtained with Anc2p are analyzed with a two-binding site model, with  $K_d$  values similar to that measured for BAnc1p (21). Interestingly, the Anc2p $\Delta$ Cter mutant still binds ADP, with the same number of maximum binding sites as Anc2p, but analysis of binding data show a single class of binding sites with a  $K_d$  value corresponding to the lowest ADP binding site affinity. This suggests that the C-terminal end of Anc2p would not constitute *per se* a nucleotide binding site but would contribute to set up the high affinity binding site for an efficient nucleotide translocation. Indeed, when the C-terminal region is deleted, the  $K_m$  value is increased in such a way that nucleotide transport is dramatically decreased. Two cooperative binding site classes were formerly hypothesized for the BAnc1p (21). However, it is interesting to note that rectilinear Scatchard plots were obtained for the binding of non-transportable nucleotides, such as N-ADP and 8-bromo-ADP, to BAnc1p (21) or N-ADP to Anc2p (17), suggesting that the observed cooperativity is linked to the "transportable" property of the ligand.

Several regions of the ADP/ATP carrier undergo CATR- or BA-induced conformational changes as evidenced by ELISA (24), limited proteolysis (19), intrinsic fluorescence changes (23), and cysteine labeling (19, 26–32). The BAnc1p N-terminal end is masked upon BA binding and exposed to anti-N-terminal antibodies upon CATR binding (24). Unfortunately, anti-C-terminal antibodies did not react with BAnc1p carrier (24). In the case of the yeast Anc2p, the C-terminal end is freely accessible to antibodies whatever the inhibitor present as well as in the presence of ADP. Surprisingly, it is masked only in the

presence of a non-transportable nucleotide analogue, N-ADP, and this effect is reversed in the presence of CATR. Therefore, we can postulate that binding of transportable nucleotides to Anc2p triggers a conformational change for the carrier to achieve a transport-competent conformation, in which the C-terminal end is freely accessible to the anti-C-terminal peptide antibodies. Also, intrinsic fluorescence measurements are a powerful tool to follow conformational changes and are more precise than ELISA, which is an all-or-nothing technique. We have mutagenized Phe at position 316 into Trp in an Anc2p variant that contained no tryptophan residues (17). The observed intrinsic fluorescence changes of Anc2p3Y-W316 provided evidence that Anc2p C-terminal end undergoes environmental modifications upon interactions with ADP or ATP (enhanced in the presence of BA) and CATR. The effect of CATR is surprising given the fact that the CATR binding site is located in the

central cavity of BAnc1p (2) probably pretty far from the C-terminal end. It could also be the case for BA, but nothing is known about the structural determinants of its binding site. These effects may merely reflect long distance changes upon ligand binding. Thus, our data clearly establish that Anc2p C-terminal end is involved in nucleotide binding path but not in the translocation step.

As a result two different regions of the carrier participate in ADP/ATP binding. This could be related to the negative cooperativity between two classes of nucleotide binding sites hypothesized first for BAnc1p (21). Such a hypothesis raises the widely debated problem of the functional oligomeric unit of mitochondrial carriers.

In summary, we have demonstrated in this paper that the last eight amino acids of the Anc2p C-terminal region are not critical for the import of the carrier protein within the mitochondrial inner membrane but, in contrast, play a prominent functional role for the interactions between carrier and nucleotides. We suggest a role of Anc2p C-terminal end during the nucleotide binding step of the transport mechanism that would be the setting-up of a high affinity nucleotide binding site.

## REFERENCES

1. Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Pebay-Peyroula, E., and Brandolin, G. (2006) *Physiology (Bethesda)* **21**, 242–249
2. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., and Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39–44
3. Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J., and Vignais, P. V. (1988) *Biochemistry* **27**, 5141–5149
4. Dianoux, A. C., Noel, F., Fiore, C., Trézéguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M.,

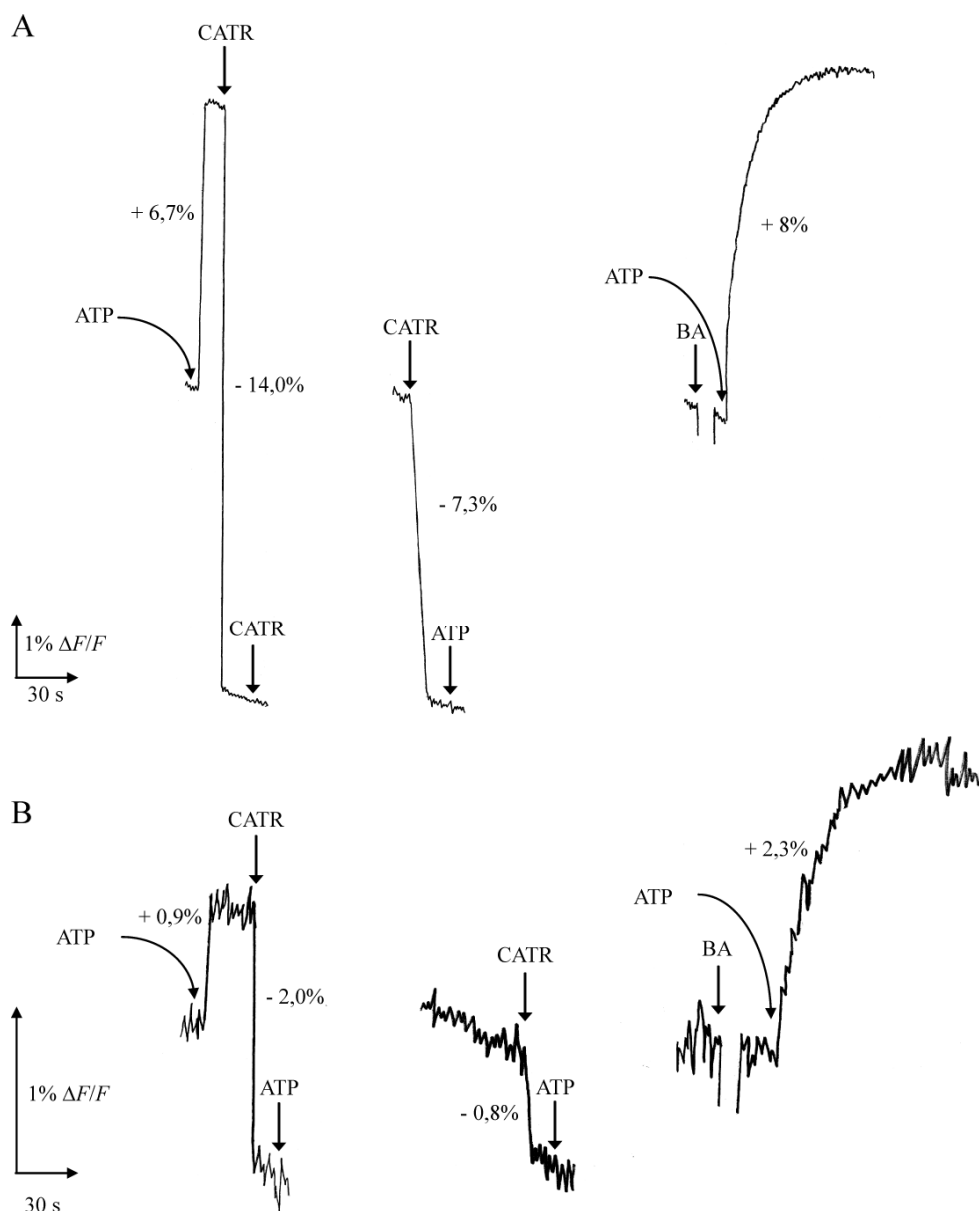
- Lauquin, G. J.-M., and Brandolin, G. (2000) *Biochemistry* **39**, 11477–11487
5. Bamber, L., Harding, M., Butler, P. J., and Kunji, E. R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16224–16229
6. Bamber, L., Harding, M., Monne, M., Slotboom, D. J., and Kunji, E. R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10830–10834
7. Bamber, L., Slotboom, D. J., and Kunji, E. R. (2007) *J. Mol. Biol.* **371**, 388–395
8. Block, M. R., Pougeois, R., and Vignais, P. V. (1980) *FEBS Lett.* **117**, 335–340
9. Klingenberg, M., Riccio, P., and Aquila, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **503**, 193–210
10. Brandolin, G., Meyer, C., Defaye, G., Vignais, P. M., and Vignais, P. V. (1974) *FEBS Lett.* **46**, 149–153
11. Lauquin, G. J.-M., and Vignais, P. V. (1976) *Biochemistry* **15**, 2316–2322
12. Block, M. R., Lauquin, G. J.-M., and Vignais, P. V. (1982) *Biochemistry* **21**, 5451–5457
13. Schlimme, E., Boos, K. S., Onur, G., and Ponce, G. (1983) *FEBS Lett.* **155**, 6–10
14. Mayer, I., Dahms, A. S., Riezler, W., and Klingenberg, M. (1984) *Biochemistry* **23**, 2436–2442
15. Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110–2114
16. Drgon, T., Sabova, L., Nelson, N., and Kolarov, J. (1991) *FEBS Lett.* **289**, 159–162
17. Le Saux, A., Roux, P., Trézéguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Vignais, P. V., Brandolin, G., and Lauquin, G. J.-M. (1996) *Biochemistry* **35**, 16116–16124
18. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425
19. Dahout-Gonzalez, C., Ramus, C., Dassa, E. P., Dianoux, A. C., and Brandolin, G. (2005) *Biochemistry* **44**, 16310–16320
20. Weidemann, M. J., Erdelt, H., and Klingenberg, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* **16**, 313–335
21. Block, M. R., and Vignais, P. V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 369–376
22. Passarella, S., Ostuni, A., Atlante, A., and Quagliariello, E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 978–986
23. Brandolin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Vignais, P. V., and Lauquin, G. J.-M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 143–150
24. Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P., and Vignais, P. V. (1989) *Biochemistry* **28**, 1093–1100
25. De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., Dianoux, A. C., Brandolin, G., and Lauquin, G. J.-M. (2002) *Biochemistry* **41**, 14412–14420
26. Kihira, Y., Ueno, M., and Terada, H. (2007) *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 885–890
27. Iwahashi, A., Kihira, Y., Majima, E., Terada, H., Yamazaki, N., Kataoka, M., and Shinohara, Y. (2006) *Mitochondrion* **6**, 245–251
28. Kihira, Y., Majima, E., Shinohara, Y., and Terada, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 184–192
29. Hatanaka, T., Kihira, Y., Shinohara, Y., Majima, E., and Terada, H. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 936–942
30. Majima, E., Koike, H., Hong, Y. M., Shinohara, Y., and Terada, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181–22187
31. Kihira, Y., Iwahashi, A., Majima, E., Terada, H., and Shinohara, Y. (2004) *Biochemistry* **43**, 15204–15209
32. Boulay, F., and Vignais, P. V. (1984) *Biochemistry* **23**, 4807–4812
33. De Marcos Lousa, C. (2002) The Human Mitochondrial ADP/ATP Carriers: Kinetic Properties and Biogenesis of Wild-type and Mutant Proteins in the Yeast *S. cerevisiae*. Ph.D. thesis, Université de Bordeaux 2

## B. Résultats complémentaires non publiés

### B.1 Les transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter présentent en solution une dynamique conformationnelle similaire vis-à-vis de ligands

La dynamique conformationnelle des transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter a été investiguée en solution dans du DDM (voir § II.3.13) à l'aide d'une analyse des variations de fluorescence intrinsèque des tryptophanes endogènes en présence de ligands (ATP, CATR et BA). Les profils cinétiques obtenus pour les transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter sont très proches l'un de l'autre (Figure III.1.1). En conséquence, *via* cette étude, l'absence d'extrémité C-terminale ne semble pas avoir d'impact sur les changements conformationnels en solution du transporteur muté induits par la présence d'ATP, de CATR ou de BA. Ce résultat suggère que le mécanisme propre du transport de l'ADP et de l'ATP dans les mitochondries n'est pas directement affecté en accord avec les données cinétiques obtenues (constante catalytique ( $k_{cat}$ ) très similaire). Par contre, nous avons pu remarquer que les propriétés biochimiques du transporteur Anc2p $\Delta$ Cter extrait de son environnement lipidique à l'état natif (en absence d'inhibiteur) s'altéraient beaucoup plus rapidement que celles du transporteur sauvage. Cette constatation se manifeste par une instabilité des émissions de fluorescence ( $\Delta F/F_{max}$ ) qui sont d'ailleurs bien inférieures à celles de la protéine sauvage (Figure III.1.1).





**Figure III.1.1 : Cinétique de la variation de fluorescence intrinsèque des transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter.** Les transporteurs Anc2p (A) et Anc2p $\Delta$ Cter (B) ont été purifiés en l'absence de ligand par chromatographie sur HTP en présence de DDM et d'Emulphogen BC720 puis filtré sur Ultrogel AcA 202 en présence de DDM. Les variations de fluorescence ( $\Delta F/F_{max}$ ) des résidus tryptophanes sont mesurées à 20°C en présence d'ATP, de CATR ou de BA employés à 5, 20 ou 20  $\mu$ M, respectivement.

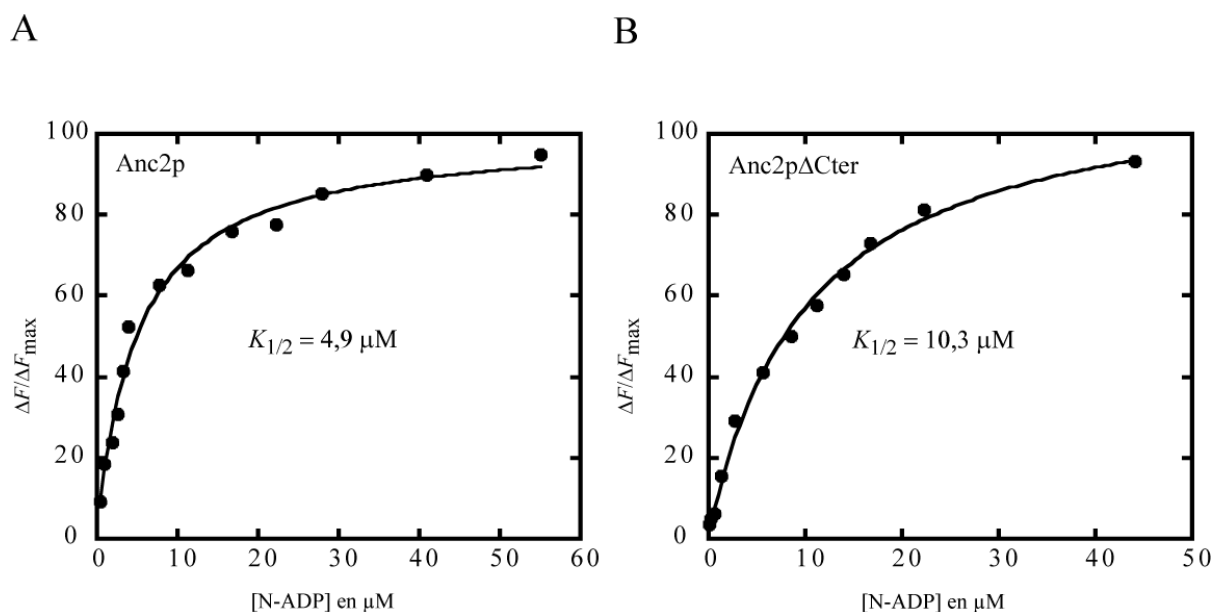
## B.2 Titration des sites BA par le 3'-0-naphtoyl-ADP (N-ADP)

La quantité de transporteur sauvage (Anc2p) ou muté (Anc2p $\Delta$ Cter) présent dans les préparations mitochondriales de levure a également été estimée en titrant les sites BA par fluorescence extrinsèque du N-ADP (voir § II.3.9). Les résultats obtenus montrent que les transporteurs étudiés sont capables de fixer le BA et sont présents en quantité équivalente dans leur membrane respective, ceux qui correspondent à une fixation de l'ordre de 600 à 700 pmol de BA par mg de protéines totales (courbes de titration non montrées). Ces résultats sont

en accord avec ceux obtenus avec [ $^3\text{H}$ ]-ATR (voir article 1) et montre que l'extrémité C-terminale d'Anc2p ne semble pas être impliquée dans la fixation du BA.

### B.3 Une délétion de l'extrémité C-terminale modifie négativement l'affinité apparente d'Anc2p pour le N-ADP

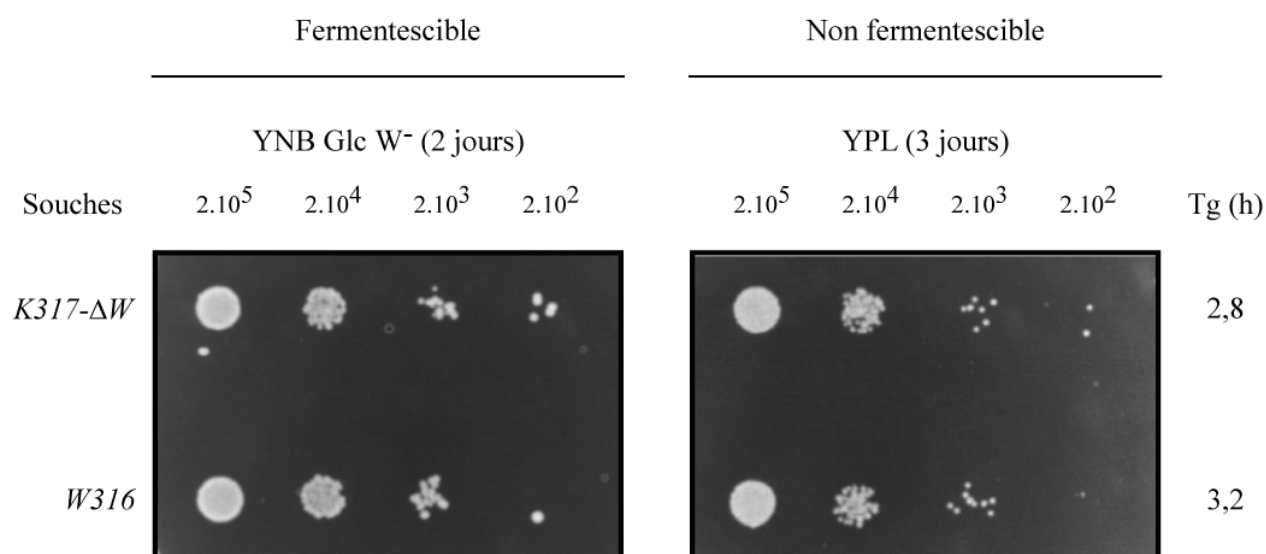
Le N-ADP est un dérivé de l'ADP non transporté. Il est présumé que le site de fixation du N-ADP correspond à celui de l'ADP ou de l'ATP sur la face intermembranaire de la membrane interne puisque ce composé ne traverse pas les membranes biologiques. La titration *in vitro* des sites N-ADP par fluorescence extrinsèque sur des préparations mitochondriales permet d'accéder à la constante d'affinité apparente du N-ADP ( $K_{1/2}$ ) pour le transporteur. Elle est illustrée dans la **Figure III.1.2**. Le transporteur Anc2p $\Delta$ Cter présente un  $K_{1/2}$  N-ADP deux fois supérieur à celui du transporteur sauvage. Ces résultats complètent les données de fixation d' $^{14}\text{C}$ -ADP publiées (voir article 1) et confirment un rôle de l'extrémité C-terminale de l'Ancp dans la fixation des nucléotides adényliques.



**Figure III.1.2 : Étude de la fixation du N-ADP sur les transporteurs Anc2p et Anc2p $\Delta$ Cter.** Pour chaque concentration de N-ADP, la quantité de ligand spécifiquement lié aux transporteurs Anc2p (A) et Anc2p $\Delta$ Cter (B) est déterminée par mesure de la fluorescence à 410 nm et à 10°C après déplacement par 5  $\mu\text{M}$  de CATR ( $\Delta F$ ). Les conditions expérimentales sont décrites plus précisément dans le chapitre Matériel et méthodes. La constante apparente de dissociation du N-ADP ( $K_{1/2}$ ) est déterminée en représentant le  $\Delta F/\Delta F_{\max}$  en fonction des concentrations en N-ADP rajoutées et exprimées en  $\mu\text{M}$ .

### B.4 Propriétés phénotypiques de la souche W316

La croissance des souches K317- $\Delta W$  et W316 a tout d'abord été analysée comparativement sur différents milieux solides : sélectif fermentescible ou riche non fermentescible (**Figure III.1.3**). Les résultats obtenus montrent une croissance similaire sur milieu fermentescible, indiquant que les différents plasmides ne sont pas toxiques pour les souches correspondantes. Des résultats similaires ont été obtenus sur milieu non fermentescible solide et liquide. En effet, les deux souches présentent des temps de génération ( $T_g$ ) très proches l'un de l'autre (**Figure III.1.3**) et diffèrent peu de la souche K317 (~2-3 heures). Ainsi, l'introduction de la mutation F316W dans le transporteur Anc2p $\Delta W$  n'affecte pas la croissance des levures sur milieu non fermentescible. En conséquence, les transporteurs sauvage (Anc2p) et mutés (Anc2p $\Delta W$  et Anc2p3Y-W316) ont donc probablement des propriétés biochimiques très similaires validant ainsi l'utilisation de ce dernier mutant dans notre étude.



**Figure III.1.3 : Analyse phénotypique de la souche de levure *JLI $\Delta 2\Delta 3u^-$*  (dépourvue de transporteur d'ADP/ATP endogène) transformée par les plasmides pMDANC2-3Y (souche K317- $\Delta W$ ) et pMDANC2-3Y-W316 (souche W316) exprimant respectivement les transporteurs Anc2p $\Delta W$  et Anc2p3Y-W316. Les clones transformés ont été dilués de  $2.10^5$  à  $2.10^3$  cellules/ml et déposés en gouttes (10  $\mu$ L) sur un milieu solides sélectif fermentescible (YNB glucose dépourvu de tryptophane : YNB Glc W⁻) ou riche non fermentescible (YPL) et mis à l'étude à 28°C pendant plusieurs jours. Les temps de générations ont été déterminés à partir de culture liquide riche YPL à 28°C.**

### III.1.2. Article 2

## Study of the conformational dynamics of the yeast ADP/ATP carrier isoform 2: Two residues of a conserved methionine rich cluster are crucial to nucleotide transport

**Benjamin Cléménçon**, Martial Rey, Gérard Brandolin, Eric Forest and Ludovic Pelosi

En cours d'écriture pour *Biochimie*, (2010)

### A. Résumé

La structure à haute résolution obtenue par diffraction des rayons X de cristaux formés par le complexe transporteur bovin-CATR (bAnc1p-CATR) a montré une protéine essentiellement organisée en hélices  $\alpha$  et présentant une pseudo symétrie d'ordre 3 (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Chaque tiers comporte deux hélices transmembranaires fortement inclinées par rapport au plan perpendiculaire à la membrane ainsi qu'une hélice courte située du côté matriciel et orientée parallèlement à la membrane (**Figure I.12**). Les six hélices membranaires forment une cavité ouverte vers l'espace intermembranaire et fermée du côté matriciel. Le col de la cavité, situé du côté de l'espace intermembranaire, forme un hexagone et le fond, du côté matriciel, est fermé par le resserrement des trois hélices transmembranaires impaires, toutes coudées au niveau d'une proline (résidu qui appartient à la signature des transporteurs de la MCF). Ce verrou peptidique est enfin stabilisé par la présence de trois ponts salins (**Figure I.13A**). Une meilleure compréhension du mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane mitochondriale passe par l'identification du second conformère capable de fixer le BA. Cependant, la structure du complexe bAnc1p-BA est actuellement inconnue. Devant les problèmes que nous avons rencontrés pour cristalliser le complexe bAnc1p-BA, il a donc été décidé d'aborder l'étude en solution des complexes transporteur bovin-inhibiteur par une analyse comparative en HDX-MS. Cette méthode peu appliquée aux protéines membranaires a nécessité une mise au point à laquelle j'ai participé et qui a fait l'objet de plusieurs publications( (Rey *et al.*, 2009; Rey *et al.*, 2010a; Rey *et al.*, 2010b), voir **Partie V**). Les résultats obtenus ont montré que les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA présentent

des différences importantes d'accessibilité au solvant et donc des états conformationnels caractéristiques de l'inhibiteur utilisé (Rey *et al.*, 2010a). Les données obtenues *via* cette approche ont corrélé celles biochimiques ou structurales disponibles dans la littérature, validant ainsi cette méthode et permettant de proposer un modèle du conformère BA à partir de l'Ancp bovin. Il a été suggéré que le complexe bAnc1p-BA soit fermé du côté intermembranaire et ouvert du côté matriciel (Rey *et al.*, 2010a). Cependant, le modèle bovin présente des limites. En effet, les approches de biologie moléculaire sont rendues difficiles par sa nature. Ainsi, la majeure partie des données fonctionnelles obtenues sur les Ancp concerne ceux de levure où la génétique est grandement facilitée. Pour l'ensemble de ces raisons, une étude de la dynamique conformationnelle du transporteur d'ADP/ATP ScAnc2p par HDX-MS a également été menée. Les résultats obtenus sont sans équivoque et montrent que les complexes ScAnc2p-CATR et ScAnc2p-BA ont des états conformationnels distincts en accord avec les données de la littérature. Cependant, il a été possible de remarquer que les transporteurs bAnc1p et ScAnc2p présentaient des dynamiques conformationnelles différentes conduisant probablement à des structures dissemblables, cette hypothèse ayant déjà été suggérées dans d'autres travaux (pour revue : (Trezeguet *et al.*, 2008)).

Les différences d'accessibilité au solvant observées pour certaines régions de la protéine, en fonction de l'inhibiteur, utilisé ont fait l'objet d'une étude fonctionnelle, en particulier la région comprenant le motif consensus RRRMMM commun à tous les Ancp (pour revue : (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2006)). Il a précédemment été montré que les résidus arginines de ce motif sont impliqués dans la fixation du CATR et dans la fermeture de la cavité (Nelson *et al.*, 1993). Concernant la fonction du triplet de résidus méthionine, un rôle dans la sélectivité des nucléotides transportés a été proposé (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Cette hypothèse a été investiguée *via* la réalisation d'une banque de mutants du transporteur ScAnc2p dans lesquels un, deux ou trois résidus méthionine ont été substitués en résidus alanine. Toutes les combinaisons ont été envisagées et les résultats comparés à ceux obtenus avec la souche *ScANC2* (RRRM₂₅₄M₂₅₅M₂₅₆) exprimant le transporteur sauvage. Les souches *scanc2-AAA*, *scanc2-AAM*, *scanc2-AMA*, *scanc2-MAA* et *scanc2-MMA* dans lesquelles un, deux ou trois résidus méthionine ont été mutées ne sont pas capables de restaurer la croissance des levures sur un milieu non fermentescible. Seules les souches simples mutants *scanc2-AMM* et *scanc2-MAM* croissent sur ce même milieu. La croissance observée de la souche *scanc2-AMM* est cependant due à l'apparition de mutants suppresseurs intragéniques « second site » localisés étrangement dans la partie supérieure de la cavité, face à l'espace intermembranaire. Ce résultat illustre la plasticité conformationnelle des Ancp. Ainsi, les

résidus méthionine 254 et 256 sont indispensables au développement des levures sur un milieu non fermentescible contrairement au résidu méthionine 255. D'autre part, la présence des Ancp mutés dans les mitochondries a été vérifiée ce qui montre que l'absence de croissance observée sur milieu non fermentescible ne résulte pas d'un défaut d'import des Ancp dans les mitochondries mais semble relever d'un problème fonctionnel et/ou conformationnel. Nous avons observé que l'ensemble des Ancp mutants présente un défaut plus ou moins important dans la fixation de l'inhibiteur ATR et donc probablement dans celle des nucléotides. Cette hypothèse a été vérifiée en réalisant *in vitro* une étude comparative des propriétés cinétiques du transport de nucléotides pour le mutant ScAnc2p^{MAM} et le transporteur sauvage. En effet, le transporteur ScAnc2p^{MAM} présente une constante de Michaelis ( $K_m$ ) apparente pour l'ADP externe trois fois plus élevée que celle du transporteur ScAnc2p. Par contre, les deux Ancp sauvage ou muté sont caractérisés par une constante catalytique ( $k_{cat}$ ) similaire. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle du résidu méthionine 255 dans la fixation de l'ADP sans pour autant modifier le mécanisme intrinsèque du transport des nucléotides.

En conclusion, ce projet a permis de corréler à une échelle moléculaire les résultats que nous avons obtenus, d'une part *via* l'étude globale en HDX-MS de la dynamique conformationnelle de ScAnc2p, et d'autre part grâce à la caractérisation biochimique du cluster de résidus méthionine présent dans la séquence conservée RRRMMM. Ainsi, il est proposé que ces résidus puissent participer aux changements conformationnels qui interviennent pendant le transport des nucléotides à travers la cavité des Ancp mais également à la spécificité des Ancp vis-à-vis de l'ADP et de l'ATP (**voir partie discussion de l'Article 2**).

## **Article 2:**

**Study of the conformational dynamics of the yeast  
ADP/ATP carrier isoform 2 : Two residues of a  
conserved methionine rich cluster are crucial to  
nucleotide transport**

## **Conformational dynamics of the yeast ADP/ATP carrier isoform 2: Two residues of a conserved methionine cluster are crucial to nucleotide transport**

**Benjamin Cléménçon¹, Martial Rey¹, Véronique Trézéguet², Gérard Brandolin¹, Eric Forest³ and Ludovic Pelosi¹**

From ¹ Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (BBSI), Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant (iRTSV), UMR 5092 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble cedex 9, France.

² Laboratoire de Physiologie Moléculaire et Cellulaire (LPMC), Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC), UMR 5095, CNRS-Université Bordeaux 2, 1, rue Camille Saint-Saëns, F-33077 Bordeaux Cedex, France,

³ Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP), Institut de Biologie Structurale (IBS), UMR 5075 CNRS, CEA, Université Joseph Fourier, F-38027 Grenoble cedex 1, France.

Running head: Conformational and functional dynamics of the yeast ADP/ATP carrier isoform 2

Address correspondence to:

Ludovic Pelosi, Ph. D., Laboratoire BBSI, iRTSV, UMR 5092 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble cedex 9, France. Tel: +0033 438783476, Fax: +0033 (0)4 38 78 51 85, e-mail: [ludovic.pelosi@cea.fr](mailto:ludovic.pelosi@cea.fr)

### **Abstract**

The mitochondrial ADP/ATP carrier, or Ancp, is a member of the mitochondrial carrier family (MCF). It exchanges ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane. ADP/ATP transport is achieved by interconversion of Ancp between two conformational states that are fixed by the specific transport inhibitors carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid (BA). The high-resolution three-dimensional structure (3D) of the beef Anc1p (bAnc1p), as the CATR-carrier complex, has been solved but the 3D-structure of the BA-carrier complex, and thus the detailed mechanism of transport, remains unknown. More recently, improvements in sample processing for hydrogen/deuterium exchange experiments



coupled to mass spectrometry (HDX-MS) have allowed us to gain novel insights into the conformational transition undergone by bAnc1p upon inhibitor binding and thus into the 3D-structure of the bAnc1p-BA complex. As molecular biology is hardly possible with the beef Anc1p to decipher the functional role of specific amino acid residues, we have investigated in this work the conformational dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* isoform 2 (ScAnc2p) by combining data from HDX-MS experiments to those obtained *via* genetic approaches which are facilitated with yeast. First, we evidenced significant differences in the solvent accessibility of ScAnc2p depending on its complexation to CATR or to BA. However, the conformational dynamics exhibited by ScAnc2p are dissimilar to those of bAnc1p, the main changes between both carriers occurring in the upper part of the cavity toward the inter membrane space. Second, we focused our studies on the methionyl residues of the RRRMMM sequence which is the signature of the Ancp. Taken together, our results highlight the involvement of the methionine cluster in the ADP/ATP transport mechanism and confirm that Ancp cavity is a dynamics structure *per se*.

## 1. Introduction

The ADP/ATP carrier (Ancp) of mitochondria is a key participant in the energy supply of the aerobic eukaryotic cells. It is the last member of the oxidative phosphorylation system, allowing ATP to be exported into the cytosol in exchange for ADP. It catalyzes one of the most active transport activities in the eukaryotic cell and it is in many higher organisms the most abundant membrane protein in mitochondria. The mitochondrial ADP/ATP exchange process can be blocked by two very specific inhibitors, namely carboxyatractyloside (CATR) on one hand and bongkreikic acid (BA) on the other hand. CATR and BA bind with high affinity to two distinct pre-existing conformations of the carrier referred to as CATR- and BA-conformations, respectively. The resulting CATR- and BA-carrier complexes are characterized by different reactivities of well defined regions of the protein to chemical, enzymatic and immunochemical reagents [1]. It has been proposed that the transition between the CATR- and BA-conformations is involved in ADP/ATP transport across the mitochondria inner membrane (MIM) [1].

Ancp belongs to the mitochondrial carrier family (MCF) which members share common features, i.e., similar molecular weights of about 30 kDa, a so-called tripartite organization consisting in three sequence repeats of about 100 amino acid residues each, and the presence of the conserved motif PX[D/E]XX[K/R] in each repeat [2]. Additionally, the

Ancp share a common signature sequence, RRRMMM, which is absent in other MCF members [3]. The intrinsic mechanisms of ADP/ATP transport, nucleotide recognition, and Ancp conformational changes have been widely investigated mainly with the bovine isoform 1 (bAnc1p) and the *Saccharomyces cerevisiae* isoform 2 (ScAnc2p) [4].

The bovine carrier Anc1p crystallized in complex with CATR is the first mitochondrial carrier for which high resolution structural data were obtained [5]. The 2.2-Å resolution model of the CATR-conformation evidenced six tilted transmembrane  $\alpha$ -helices that form a wide cavity open toward the intermembrane space (IMS) and closed on the matrix side [5]. In contrast to the CATR-bound bAnc1p, the 3D-structure of the bovine carrier complexed to BA still remains to be uncovered. Recently, both complexes were comparatively studied by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectroscopy (HDX-MS) analyses providing new informations on the BA-conformation and thus on the functional dynamics of bAnc1p during the ADP/ATP transport process [6]. However, the bovine model remained limited to biochemical studies of the native form because its over-expression in bacteria or in yeast is tedious [7]. On the contrary, the yeast carrier ScAnc2p has been widely studied by site-directed mutagenesis leading to the idea that bAnc1p and ScAnc2p present some distinct biochemical properties [8] but similar structural features, i.e. a common 3D-structure formed by six transmembrane helices and three large loops exposed to the solvent.

We have therefore investigated the conformational dynamics of ScAnc2p by HDX-MS. The results obtained are discussed with respect to the biochemical data available on ScAnc2p and more generally on the Ancp. We have then focused our studies on the signature sequence of Ancp, RRRMMM, and more precisely on the triplet of methionyl residues. Our results have shown that differences measured in deuterium accessibility between ScAnc2p-CATR and ScAnc2p-BA complexes are linked to the conformational transition occurring during the transport mechanism. Moreover, we provide new insights into the methionine triplet which could contribute to the ADP/ATP-binding step and to the structural synergy between each side of the carrier as shown by selection for spontaneous suppressors.

## 2. Material and methods

### 2.1 Chemicals and immunochemicals

BA and [ $^3\text{H}$ ]-atractyloside ([ $^3\text{H}$ ]-ATR) were prepared as previously described [9, 10]. Hydroxylapatite (HTP) was from Bio-Rad. Triton X-100 and *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside

(DDM) were purchased from Anatrace. CATR, pepsin, and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma/Aldrich. Recombinant type XVIII protease was obtained as described in [11]. Trifluoroacetic acid, acetonitrile and dichloromethane were purchased from Sigma/Aldrich, Carlo Erba Reagenti and Riedel de Haën, respectively. Rabbit polyclonal antibodies against yeast SDS-treated-VDAC1 were generously provided by Guy Lauquin (Université Bordeaux 2, France). The polyclonal ScAnc2p antibodies used were generated in rabbits against HTP-purified ScAnc2p after SDS treatment.

## 2.2 Bacterial and yeast strains and media

The *Escherichia coli* strain used in this work was JM109: *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*, [F', *traD36, proAB, lacI^qΔM15*] (Promega). The bacterial strain was grown on LB medium (Difco) supplemented with 100 μg/ml ampicillin when necessary. Bacteria were transformed according to standard classic methods using  $CaCl_2$  [12]. The following *S. cerevisiae* strains were used in this study: *W303-1B* (*MATα leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 trp1-1 ura3-1 can1-100*) and its derivative *JL1-3* (*W303-1B anc1::LEU2 anc2::HIS3 anc3::URA3*) [13], *JL-1Δ2Δ3u⁻* (*JL1-3 Δanc2::HIS3 Δ[269–975]anc3*) [14], *JL1-3 ANC2* and *JL1-3 ANC2(His₆)* (*W303-1B anc1::LEU2 anc3::URA3*) [15] and *JL1-3 ANC2Δpor1-ANC2* (*W303-1B anc1::LEU2 anc3::URA3 por1::HIS3*) (A. Le Saux, unpublished data). The strains were cultivated and transformed as described in [16]. The compositions of all the media used, YPL (lactate-containing riche medium), YNB Glc W⁻ or YNB Gal W⁻ (glucose- or galactose-containing minimum medium deprived of tryptophan, respectively) are described in [16].

## 2.3 Site-Directed Mutagenesis (see Table 1)

Site-directed mutagenesis of *ScANC2* was performed using the Transformer site-directed mutagenesis kit (Roche) with the mutagenic primers presented in Table 1. The mutated *scanc2* genes were subcloned into a centromeric plasmid, pRS314, under the control of *ScANC2* regulatory sequences as described in [17]. The resulting plasmids were used to transform the *JL1Δ2Δ3u⁻* strain with the LiCl procedure [18] and their abilities to complement the *ScANC2* deletion were assessed on YPL.

## 2.4 Isolation of mitochondria

Yeast cells grown on YPL or on YNB Gal W⁻ were harvested during the late log phase (OD₆₀₀ nm near 5 in YPL or near 3 in YNB Gal W⁻). Mitochondria were prepared as previously described [8].

## 2.5 ADP/ATP transport assay with isolated mitochondria

ADP/ATP transport was measured by means of a luminescence assay as described in Dassa *et al.* [19]. Freshly prepared mitochondria were incubated at 25 °C in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM KH₂PO₄, 0.6 M mannitol, 0.1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 10 µM Ap5A (an inhibitor of adenylate kinase), and 1 mM α-ketoglutarate in the presence of 0.1% (w/v) luciferin and 0.1% (w/v) luciferase.

## 2.6 [³H]-ATR Binding Assays.

[³H]-ATR binding assays on isolated mitochondria were carried out as described by Brandolin *et al.* (1993) [3]. Briefly, mitochondria were diluted (0.5-1 mg of protein/mL) in a standard medium (1 mL) consisting of 0.12 M KCl, 10 mM Mops, and 1 mM EDTA, pH 6.8, and [³H]-ATR was added at increasing concentrations up to 3 µM, respectively. After 45-min incubation at 0°C, the mitochondria were sedimented and radioactivity of the pellet was determined by scintillation counting (Ready Value, Beckman). Parallel assays were performed in the presence of 20 µM CATR to correct for minor nonspecific binding of [³H]-ATR.

## 2.7 Purification of the ADP/ATP carriers

The ADP/ATP carrier proteins were isolated from yeast mitochondria as a CATR-carrier complex or a BA-carrier complex. ScAnc2p was enriched from the strain *JLI-3 ANC2* or *JLI-3 ANC2Δpor1* by HTP in the presence of Triton X-100 detergent (1% (w/v) final concentration) following the method described in [3]. C-terminal histidine-tagged carrier was purified from the strain *JL1-3 ANC2(His₆)* in the presence of DDM detergent (0.05% (w/v) final concentration) according to the procedure described by Fiore *et al.* [15]. The final carrier

protein concentration in each purified fraction ranged between 0.05 and 0.1 mg/ml depending of the method used.

### *2.8 ADP/ATP carrier digestion*

All protein digestions in solution were performed in an ice bath at 0°C. Protease solutions were prepared in 20 mM glycine, pH 2.5, and cooled to 0°C. The ADP/ATP carrier was digested in 20 mM glycine, pH 2.5 for 2 min using a substrate/protease ratio of 1:0.25 to 1:2 (w/w) for pepsin and 1:1.5 to 1:24 (w/w) for recombinant type XVIII protease. Online digestion of the ADP/ATP carrier in presence of 1M guanidinium chloride (GndCl) was performed in an ice-bath at 0°C using a column packed with pepsin immobilized on a POROS-20AL resin as described in [11].

### *2.9 SDS-PAGE and Western blotting*

The protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Sigma/Aldrich) with BSA as a standard. For SDS-PAGE, samples were prepared as described in [8]. Antibodies directed against SDS-treated ScAnc2p or yeast SDS-treated-VDAC1 were used at a 1:1500 and 1:1000 final dilution, respectively. Immunodetection was performed using horseradish peroxidase (HRP)-coupled protein A and the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Biosciences).

### *2.10 H/D exchange of ADP/ATP carrier complexes*

After purification and concentration of the ADP/ATP carrier-inhibitor complexes above 5 mg protein/mL, the HDX reaction was initiated by a 10-times dilution into a deuterated buffer containing 10 mM MOPS-NaOH, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.8 and performed at 4°C. Time-course of the H/D exchange was followed over a 10 000 s period of time by sequential withdrawing of 80 µL deuterated samples which were immediately added to 20 µL of quenching buffer (1 M Glycine-HCl pH 2.5), rapidly mixed and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were stored in liquid nitrogen until they were analyzed.

### 2.11 High pressure liquid chromatography

Peptides obtained by on-line protein digestion were loaded onto a peptide MacroTrap column (Michrom Bioresources, Auburn, CA). Samples were desalted and the detergent and lipids were removed as previously described [20]. The peptides were separated on a C18 reversed phase column (1x100 mm, Jupiter; Phenomenex) in the same conditions as in [20]. To minimize the back-exchange, the valves, trap column and analytical column were cooled to 0°C by immersion in an ice-water bath. Protein mass measurement was performed as follows: 200 pmoles of the carrier solubilized in 0.05% DDM were loaded onto the Protein MacroTrap column. The sample was desalted during 1 min with 200 µL of water. Then the protein and the detergent were eluted from the Protein MacroTrap and separated through a C8 RP-column.

### 2.12 MS analyses

The liquid chromatography tandem MS (LC ESI-MS/MS) analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000+, Bruker Daltonics). The HPLC system was connected directly through a splitting T-piece to the ESI source of the spectrometer. The settings were described in details in [20]. Data were processed using DataAnalysis 3.0 and MS/MS spectra were searched with MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) against single protein database containing ScAnc2p sequence. The analyses of deuterated samples and accurate mass measurements were done on a liquid chromatography electrospray time-of-flight MS (LC ESI-ToF-MS) (6210 system, Agilent Technologies). Isotope envelopes were extracted with Mass Hunter Qualitative Analyses software (Agilent Technologies) and the centroid of the isotopic distribution was measured with MagTran software (Zhongqi Zhang, Amgen, Thousand Oaks, CA) [21]. Representation of carrier mapping was done with the DrawMap program available at <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/>.

## 3. Results

### 3.1. Molecular weight of the yeast ADP/ATP carrier isoform 2 (ScAnc2p) Figures 1A

The exact number of amino acids and the presence of any post-translational modifications of the mature ScAnc2p have never been determined so far. We took advantage

of LC ESI-ToF-MS experiments to determine its accurate molecular weight as previously described in (Mehmood *et al.*, 2011). Since HTP-purified ScAnc2p preparations contain several contaminant proteins, mainly the mitochondrial porin isoform one (VDAC1), and large amount of ergosterol and detergent [22], we purified a modified form of the yeast carrier carrying a six-histidine extension at its C-terminal end (ScAnc2p-(His₆)) to remove the contaminants and to decrease the amount of detergent facilitating MS analysis. From the deconvoluted mass spectrum, the purified ScAnc2p-(His₆) exhibits a molecular weight of 35549 Da (Fig. 1A) which was in agreement with the calculated mass of 35547 Da for an ScAnc2p-(His₆) of which the N-terminal methionyl residue was removed and the new N-terminal residue, a serine, was acetylated.

### 3.2. Purification and pepsin digestion of ScAnc2p (Figures 1B and 1C)

ScAnc2p purified by a single chromatographic step on HTP contained ScVDAC1 as a major contaminant (Fig. 1B, lane 1) [22]. To obtain a highly purified unmodified ScAnc2p (without His₆-tag), suitable for structural and conformational analyses, we used *JLI-3 ANC2Δpor1* strain in which the genes encoding Ancp isoforms 1 and 3 (*ScANC1* and *ScANC3*) and ScVDAC1 were disrupted. ScAnc2p complexed to CATR or BA was therefore isolated in Triton X-100 (relevant for HDX-MS studies as shown in [20]) as a pure protein (Fig. 1B, lane 2). Digestion of ScAnc2p as a CATR-complex was first assayed in solution with two different acidic proteases and the corresponding lysates were subjected to Western blotting using antibodies raised against SDS-treated ScAnc2p (Fig. 1C). The proteases were used at an enzyme/ScAnc2p ratio (w/w) of 0.25 to 1 for the pepsin from Sigma/Aldrich, and of 1.5 to 24 for the home-made recombinant type XVIII protease [11]. The results showed unequivocally that pepsin was the most efficient protease to digest ScAnc2p since no residual fragment was immunodetected at enzyme/ScAnc2p ratio (w/w) of 1 (Fig. 1C). Type XVIII protease was able to digest almost completely ScAnc2p but at a high enzyme/ScAnc2p ratio (w/w) of 24. Similar results were obtained with the BA-carrier complex (not shown). Consequently, pepsin was more effective on ScAnc2p and thus used in the following experiments. As was shown in our previous works on soluble and membrane-bound proteins, the use of immobilized proteases offers several advantages in HDX-MS experiments [6, 11, 20]. Alongside higher protease stability and the absence of auto-digestion, more important are the much higher local concentration of protease leading to better digestion efficiency and the possible use of chaotropic reagent such as GndCl. Thus, to reach a fast, efficient and highly

reproducible digestion of ScAnc2p complexed to CATR or to BA, we performed the proteolysis steps online using a column packed with immobilized pepsin.

### 3.3. Peptide mapping of ScAnc2p covers half of the carrier sequence (Figure 2)

We digested ScAnc2p as a CATR- or BA-carrier complex as described above and LC ESI-MS/MS analyses were performed. On the basis of the MS/MS spectra, we identified 55 peptides covering homogenously 76% of the protein sequence (results not shown). Only the N-terminus region of ScAnc2p was not covered probably due to the presence of many prolyl residues which would impair the action of the protease. However, protein coverage fell to 51% in HDX-MS (20 peptides) due to low signal-to-noise or overlapping signals (Fig. 2). Consequently, analysis of helices H3, H5 and H6 was limited to only one peptide region. Combinations of pepsin and type XVIII protease were also tested in solution with no better success (not shown). A column packed with immobilized recombinant type XVIII protease was also used with no improvement of the protein coverage in HDX-MS (not shown).

### 3.4. The conformational dynamics of ScAnc2p revealed by HDX-MS exhibits a better deuterium exchange in presence of BA than in the presence of CATR (Figure 2)

The conformational dynamics of Triton X-100 extracted-ScAnc2p was investigated by HDX-MS. In order to monitor local HDX kinetics of individual parts of ScAnc2p in complex with CATR or BA, we digested the protein after 10 to 10 000 s of incubation in a deuterium containing buffer. Results obtained for each peptide region are presented in Fig. 2. All the regions analyzed exhibited inhibitor sensitive deuterium accessibility. Moreover, the deuteration was still higher and/or faster for the ScAnc2p-BA complex than for the ScAnc2p-CATR complex (Fig. 2), suggesting that the amidic proton of the BA-conformer was overall more exchangeable with deuterium than those of the CATR-conformer throughout the amino acid sequence.

In the 3D structure of the bovine Anc1p, loops m1 to m3 are situated parallel to the membrane surface and appear to strengthen the closed conformation of this carrier on the matrix side in presence of CATR [5]. In our studies of ScAnc2p, loop m1 was covered mainly by regions 64-70 and 74-85, loop m2 by regions 156-172 and 177-188 and finally loop m3 by regions 258-268 and 278-283 (Fig. 2). In presence of CATR, amide protons of the loops m1 and m3 were overall more readily exchangeable with deuterium than those of the loop m2.



The region 258-268 located in the loop m3 was the most deuterated (80-90% of HDX at the end of the experiment). In contrast, the region 177-188 from the loop m2 was the most protected from the deuteration (20-30% of HDX at the end of the experiment). In the BA-carrier complex, amidic protons of the loops exhibited a better deuterium exchange than in the CATR-carrier complex. Interestingly, regions 64-70, 156-172 and 258-268 located mainly at the N-terminal coil of matrix helices were deuterated faster in the BA-carrier complex than in the CATR-carrier complex, but the level of deuteration recorded at the end of the experiment was overall inhibitor insensitive (Fig. 2). In contrast, regions 74-85, 177-188 and 278-283 encompassing a major part of the C-terminal coil of matrix helices did not present the same behaviour and were faster and higher deuterated in presence of BA. In overall, these results were consistent with the better exposure of matrix loops to the solvent in the BA-conformer which could correspond with the opening of the carrier toward the matrix as hypothesized earlier for the bovine carrier [6]. However, the lower level of deuteration measured for the loop m2 in the CATR-carrier complex is difficult to interpret compared to the other loops because of their similar predicted location toward the matrix.

From the structure prediction based on the bovine Anc1p, helix H1 was covered by regions 24-27, 34-44 and 50-55; helix H2 was covered by regions 87-93, 94-104 and 106-115; helices H3, H5 and H6 were only covered by regions 123-130, 251-256 and 291-303, respectively and regions 190-198, 200-209 and 211-218 fully covered helix H4. In the CATR-carrier complex, helix H1 exhibited a very low level of deuterium incorporation throughout the sequence ( $\leq 30$ -40% of HDX) but with a N-terminal part (region 24-27, 30-40% of HDX) slightly more deuterated at the end of the experiment than the others located in the C-terminal half (regions 34-44 and 50-55, 10-20% of HDX). Helices H2 and H4 do not have the same behaviour, i.e. their N-terminal (regions 87-93 and 190-198, respectively) and C-terminal (regions 106-115 and 211-218, respectively) parts presented significantly a faster and higher deuteration than the regions inside the helices (regions 95-104 and 200-209, respectively). But, in overall, the major part of helix H4 toward the IMS remains more protected from the deuteration (0-10% of HDX between 10-100 s of incubation) than the corresponding part in helix H2 (0-40% of HDX between 10-100 s of incubation). Region 251-256 corresponding to the N-terminal extremity of helix H5 was also protected from the deuteration in the time course of the experiment (0-20% of HDX). Regions 291-303 and 309-311 covering the last parts of the carrier (helix H6 and the C-terminal extremity predicted to be outside the MIM, respectively) were protected from the deuteration at the beginning of the deuterium exchange (0-10% of HDX between 10-100 s incubation for the region 291-303 and between 10-1000 s

incubation for the region 309-311). A similar behaviour was also observed for region 123-130 located in the N-terminal extremity of helix H3 (0-20% of HDX between 10-100 s of incubation). All these results suggest that the major part of the carrier cavity was rendered little accessible to the solvent in the CATR-carrier complex. In presence of BA, a better deuterium exchange was still obtained for each described region. The largest differences were observed for regions 34-44 and 251-256 encompassing parts of the first and third MCF motif (helices H1 and H5) and for regions 50-55, 87-104, 190-198 covering the lower part of the cavity toward the matrix. These results are in agreement with the opening of the carrier to the solvent in the BA-conformation. On the contrary, smallest differences were recorded for regions 24-27, 106-115, 123-130 and 211-218 suggesting that the upper part of the cavity toward the IMS was slightly less sensitive to the inhibitors used. These results are discussed in the following.

Region 251-256 covering the common signature sequence  $^{251}\text{RRRMM}^{256}$  of the Ancp was faster deuterated in the presence of BA and the final level of deuteration was also higher. In the 3D-structure of the bovine carrier obtained in presence of CATR, the methionine cluster occupies a bulky volume that could control the access of the cavity from the matrix side, acting as a plug during the transport mechanism [5]. Considering this hypothesis and our results about the RRRMMM region in HDX, we have therefore investigated the functional role of the triplet of methionyl residues. Our approach was based on the expression and biochemical characterization of ScAnc2p variants of which we mutated the three methionyl residues into alanyl residues, simultaneously, in pairs or one at a time.

### 3.5. Growth phenotypes on a non-fermentable carbon source show differing involvement of the MMM cluster. (Figure 3 and Table 2)

When the three methionyl residues were mutated simultaneously into alanyl, the resulting carrier, ScAnc2p^{AAA}, did not rescue *JLIΔ2Δ3u⁻* growth on a non-fermentable carbon source medium (YPL) (Fig. 3A). Thus, one, two or three of these residues may play a crucial role in nucleotide transport assuming that there is no impairment in the import of the carrier into the MIM. Introduction of two alanyl residues (ScAnc2p^{AAM}, ScAnc2p^{AMA} and ScAnc2p^{MMA}) did not allow to restore *JLIΔ2Δ3u⁻* growth on YPL (Fig. 3A). Mutation into alanine of one residue at a time (ScAnc2p^{AMM}, ScAnc2p^{MAM} and ScAnc2p^{MMA}) clearly evidenced that each methionyl residue has a different role in ScAnc2p transport function (Fig. 3A). Indeed, *scanc2/MMA* was unable to develop on YPL while *scanc2/MAM* displayed a slow growth

phenotype with a doubling time of 5 h with  $A_{600\text{nm}} = 10$  for the saturation phase, whereas that of *ScANC2* was 2.5 h with  $A_{600\text{nm}} = 13$  for the saturation phase (Fig. 3B and Table 2). In the case of *scanc2/AMM*, growth on solid YPL was evident only after 7 days. Furthermore, its growth curve was striking since it was described by two phases. Indeed, for 50-70 h the doubling time was approximately 30 h. Then  $A_{600\text{nm}}$  increased rapidly corresponding to a doubling time of 4 h (Fig. 3B). Interestingly, the  $A_{600\text{nm}}$  value at the growth plateau was 12, which corresponded to a minor decrease of the biomass yield as compared to the wild type strain (Fig. 3B). These results suggested that the mitochondrial metabolism in *scanc2/AMM* could reach the same efficiency as in the wild type strain but only after an important metabolic adaptation, which strikingly completely disappeared when the strain in its stationary phase was inoculated in fresh YPL (results not shown). Occurrence of intragenic or extragenic suppressors of the M254A mutation was further investigated.

### 3.6. Compensatory mutations in *ScAnc2p*^{AMM} can rescue *scanc2/AMM* growth on a non-fermentable carbon source. (Table 3 and Figure 4)

After an overnight culture in a liquid selective synthetic minimal medium, *scanc2/AMM* cells were plated onto YPL and incubated for 10 days at 28°C to select for regain-of-function revertants. 30 clones were analyzed by isolating and sequencing their *scanc2* gene. None of them corresponded to true revertants but 17 contained an intragenic second-site mutation, including 12 unique mutations, in 11 different codons (Table 3). The location of these mutations on the hypothetical 3D-structure of ScAnc2p is shown in Fig. 4. All the mutants are located on the same side of the membrane (IMS) and far from their parent mutations, regarding both the amino acid sequence and the putative 3D structure. In order to confirm that the observed phenotypes were due specifically to the mutations identified in the *scanc2/AMM* gene, all the *scanc2/AMM* genes carrying an additional mutation were subcloned into fresh plasmids and thereafter used to back-transform *JL1Δ2Δ3u⁻*. The back-transformed cells exhibited growth properties on YPL similar to that of *ScANC2* (results not shown). Therefore, we conclude that the observed phenotypes were only due to the occurrence of compensatory mutations in the *scanc2/AMM* gene during growth of transformed *JL1Δ2Δ3u⁻*. Besides, since *scanc2/MMA* exhibited a definitive growth defect in YPL, the modification induced by the M256A mutation appears to be too deleterious to be compensated by a single amino acid mutation (Fig. 3A).

### 3.7. All variant genes lead to ScAnc2p production in mitochondria. (Figure 5)

YPL growth impairment of *JLIΔ2Δ3u⁻* transformed with the plasmids encoding the variants of the methionine cluster could be related to a lower content of ScAnc2p in MIM. Therefore, the carrier content was evaluated in mitochondrial lysates of each variant by Western blot analyses after SDS-PAGE. Yeast VDAC1 was used as a control for the amount of mitochondrial proteins loaded on the gel (Fig. 5). All the strains were grown in galactose, a fermentable carbon source. ScAnc2p is immunodetected in every transformant and the relative amounts of all variants were similar to that of the wild type carrier (Fig. 5, lanes 1 to 8). Consequently, the absence of growth observed on YPL may not be explained by an import defect of the mutated carriers into the MIM. Thus, we hypothesized impairment of the ADP/ATP exchange activity of the corresponding variants, i.e. ScAnc2p^{AAA}, ScAnc2p^{MAA}, ScAnc2p^{AMA}, ScAnc2p^{AAM} and ScAnc2p^{MAM}. The mitochondrial content of ScAnc2p^{MAM} was also evaluated by Western blotting after yeast growth on YPL. The results suggest that ScAnc2p^{MAM} is less imported and/or less stable in the MIM than the wild type carrier (Fig. 5, lanes 9 and 11). Besides the regain-of-function of the second site revertants was linked to a normal production of ScAnc2p as can be seen for example for the double mutant M255A-Y206H (Fig. 5, lane 10).

### 3.8. Every residues of the methionine cluster are essential to ATR-binding. (Table 3)

To quantify more precisely the variants of the methionine cluster, we performed [³H]-ATR-binding experiments with isolated mitochondria. When cultivated in presence of a fermentable carbon source such as galactose, mitochondria from *ScANC2* and *scanc2/MAM* strains present similar maximum numbers of ATR-binding sites ( $B_{\max}^{\text{ATR}}$ ), approximately 120 pmol.mg⁻¹. In presence of a non-fermentable carbon source, the  $B_{\max}^{\text{ATR}}$  value for the *scanc2/MAM* mitochondria was about 3.3 lower than for the wild type ones (205 versus 680 pmol/mg proteins) while the cytochrome aa3 content did not vary significantly (data not shown). Similar data were obtained using 3'-O-naphthoyl-ADP and 6-O-naphthoyl-ATR as a probe to quantify Ancp in mitochondria (data not shown). As a result, the amount of ScAnc2p^{MAM} variant in the MIM could account for the phenotype observed with *scanc2/MAM* in YPL. On the other side, using the wild type carrier as a reference, the ATR-binding properties were dramatically modified for all the carrier variants. Indeed, ScAnc2p^{MAM} variant presents an ATR dissociation constant ( $K_D^{\text{ATR}}$ ) value 3 times higher than that of the wild type

carrier (Table 3). All the other variants are unable to bind ATR. These results suggest that the carriers in the MIM are improperly folded to recognize ATR and probably nucleotides. Interestingly, compensatory second-site mutations in ScAnc2p^{AMM} can rescue ATR-binding. For example, the double mutant M255A-Y206H presents  $B_{\max}^{\text{ATR}}$  and  $K_D^{\text{ATR}}$  values similar to that of ScAnc2p, i.e. 620 pmol.mg⁻¹ and 550 nM, respectively.

### 3.9. Methionine 254 and 256 from the MMM cluster are crucial to nucleotide translocation or binding. (Table 3)

Measurements of the ADP/ATP transport of wild type and ScAnc2p^{MAM} were carried out by the luciferase/luciferin system with mitochondria isolated from the corresponding strains growing on YPL. As shown in Table 3, the  $V_{\max}$  value for ScAnc2p^{MAM} was about 4.4 lower than that for ScAnc2p. However, considering an unchanged  $k_{\text{cat}}$  value, we can hypothesize that M255 would not participate in the translocation process *per se*. The apparent  $K_m$  value of external free ADP for ScAnc2p^{MAM} was about 3.2 higher than for ScAnc2p (Table 2), suggesting that M255 could be involved in the ADP-binding step. All these results could account for the reduced growth observed on YPL for *scanc2/MAM*. In contrast, M254 and M256 were crucial to nucleotide translocation or binding since we were unable to measure a significant ADP/ATP transport activity on mitochondria freshly isolated from the strains *scanc2/AMM* and *scanc2/MMA* grown under fermentable conditions.

## 4. Discussion

The physiological role of Ancp is to export ATP from the mitochondria in exchange for external ADP. During the transport mechanism, the carrier switches between two different conformations that can be blocked by two inhibitors: CATR and BA. Therefore, our understanding of the nucleotide transport mechanism can be improved by studying the structural differences between the individual inhibited states. The 3D-structure of bAnc1p complexed to CATR shows a cavity that is only accessible from the IMS. It was suggested that CATR-binding occurs at a site identical to or overlapping the ADP-binding site, thus preventing ADP/ATP transport (ref). The 3D-structure of bAnc1p complexed to BA still remains unknown. However, we recently demonstrated using HDX-MS that the bAnc1p-BA complex exhibits greater accessibility to the solvent on the matrix side whereas the bAnc1p-CATR complex is more accessible on the IMS side in agreement with the literature about the

bovine carrier [6]. A closing of the cavity on the IMS side and its opening toward the matrix was then proposed to explain the deuterium incorporation data obtained with the bAnc1p-BA complex. From this work, we have point out that the deuterium exchange of some peptide regions of this carrier varied greatly depending on the inhibitor tested. Their study in the ADP/ATP transport mechanism requires approaches combining genetic and biochemical studies. However, bovine model is not suitable for it. Conversely, the yeast carrier ScAnc2p has been widely studied by site-directed mutagenesis. Consequently, we have decided to analyze in HDX-MS the conformational dynamics of peptide regions of ScAnc2p in order to highlight their functional role in the ADP/ATP transport mechanism.

As demonstrated for the bovine carrier, ScAnc2p exhibits also distinct accessibility to the deuterium in an inhibitor-dependent manner. These results are in agreement with their inhibitor sensitive-reactivities to chemical, enzymatic and immunochemical reagents [8, 23-27]. The better deuteration of matrix loops in presence of BA underlines their concomitant rearrangement, leading probably to improve the solvent accessibility of regions of the carrier located to the lower part of the cavity toward the matrix as also observed in the study of bAnc1p by HDX-MS [6]. Indeed, the regions 50-55, 87-104 and 190-198 located in the bottom of the cavity in the predicted 3D-structure of ScAnc2p were more highly deuterated in the ScAnc2p-BA complex than in the ScAnc2p-CATR complex throughout the time-course of the experiment (Fig. 2). The largest differences were observed for regions 34-44 and 251-256 encompassing parts of the first and third MCF motif (Fig. 2). Taken together, these results suggest the opening of the cavity on the matrix side in the BA-conformer as previously hypothesized for the bovine carrier and underline again a pivotal role of the signature motives in the conformational dynamics of the Ancp [6]. Other similarities were observed between both carriers. For example, helix H4 encompassing the aromatic ladder conserved in all the Ancp exhibited in the yeast (this work) and the bovine [6] carriers a deuterium exchange much less sensitive to the inhibitor used.

However, our results point out also some differences between yeast and bovine carriers. From the structure prediction based on the bovine Anc1p, loop m2 of ScAnc2p was postulated to face the matrix compartment leading probably to a good exposure to solvent facilitating deuterium exchange in both complexes. This behaviour was already observed in the conformational dynamics of bAnc1p [6]. Interestingly, in our HDX-MS experiments, the major part of loop m2 of ScAnc2p complexed to CATR was protected from the deuterium exchange compared to the other two loops. Moreover, its N-terminal coil (region 156-172) remained little deuterated whatever the inhibitor used (Fig. 2). Recall that the role of the loop

m2 in substrate-binding was already demonstrated for the yeast carrier of which the peptide 182-190 was photolabeled by 2-azido-3'-*O*-naphthoyl- $[\beta^{32}\text{-P}]\text{-ADP}$  [28]. Other results have shown that region 156-192 intrudes peptide extensions into the cavity in a conformation-sensitive manner [8] which would be in agreement with the protection of this region against deuteration. In the bovine crystal structure, which is that of the CATR-carrier complex, matrix loops do not intrude into the membrane or into the cavity and present similar folding [5]. Taken together, all these results suggest conformational differences between bovine and yeast carriers at the level of the matrix loop m2 and whatever the complex analyzed.

Contrary to all expectations, our results highlight also differences in the deuterium incorporation level of the upper part of the cavity toward the IMS between the yeast and bovine carriers. Unlike what was observed with bAnc1p, this region is weakly deuterated in the ScAnc2p-CATR complex. Moreover, it is simply faster deuterated in the ScAnc2p-BA complex and the final level of deuteration remained overall similar at the end of the experiment whatever the inhibitor used (30-50% of deuterium exchange). These results are in agreement with those obtained previously about the regions of ScAnc2p equivalent to loops c1 and c2 facing the IMS in bAnc1p which were accessible *in organello* to non permeable alkylating reagents in an inhibitor-independent manner [29, 30]. Thus, this part of the cavity which was in overall protected from the deuteration differs little from one conformer to another in its accessibility to the solvent. This behaviour could be linked to the presence of parts of the loop m2 going back into the cavity in both complexes as demonstrated by Dahout-Gonzalez *et al.* (2005). Indeed, in this work, parts of loop m2 of the yeast carrier were accessible surprisingly from the IMS to externally added trypsin or non permeable alkylating reagents in presence of inhibitors [8]. Finally, only the C-terminus of the protein differs from one conformer to another in this side of the carrier. This part of the protein was covered in our study by a small region from residue 309 to 311 which showed a higher deuteration in the ScAnc2p-BA complex than in the ScAnc2p-CATR complex from 300s of HDX to the end of the experiment. This result was in agreement with the conformational changes already suggested for the N-terminal extremity of ScAnc2p occurring in the recognition, the binding and the transport of nucleotides [16].

Among the peptide regions that strongly differ in deuterium exchange in an inhibitor-dependent manner, we have one that encompassed the motif RRRMMM that is highly conserved in the Ancp [31]. Our results underline a role of this motif in the conformational dynamics of ScAnc2p. Recall that the 3D structure of bAnc1p revealed that this motif was implicated in the CATR-binding inside the cavity and probably in the nucleotide transport

mechanism [5]. The role of the arginine triplet was previously investigated in ScAnc2p [32, 33]. Arginyl residues are essential since in the three single arginine mutants into isoleucine, no intracellular oxidative ATP production was detected. All the corresponding variants were imported in mitochondria and surprisingly conserved their binding capacity to CATR and to BA [33]. We addressed in the present work the second part of this signature sequence, the methionine triplet whose function remains unknown. In this aim, we have investigated the functional role of each of these three methionyl residues in ScAnc2p by mutating each of them into alanine.

Mutating the three methionyl residues one at a time has showed that residue M255 was not essential to retain transport activity since ScAnc2p and ScAnc2p^{MAM} exhibit very similar  $k_{cat}$  values. Contrariwise, ScAnc2p^{MAM} presented a significant decrease in ATR affinity and the apparent  $K_m$  of external free ADP for this variant was 3-times higher than for the wild type (Table 2). Because of the overlapping of ATR- and ADP-binding sites, at least partially as suggested in [7], our results suggest a defect in ADP-binding ability in a residue M255-dependent manner. Although there is no evidence of direct interaction between CATR and the methionine triplet in the bovine 3D-structure [5], we can notice that residue M238 in bAnc1p (equivalent to residue M255 in ScAnc2p) is directed inside the cavity in the CATR-conformation. Thus, this residue could participate in the stabilization of ADP in the cavity assuming that the CATR-conformation mimics the ADP-binding one. When the three methionyl residues were mutated simultaneously or in pair, yeast growth on YPL was impaired. Indeed, we have shown that M254 and M256 seem to be essential to retain transport activity but also to retain ATR-binding. Residues M237 and M239 (equivalent to M254 and M256 in ScAnc2p) in the bAnc1p-CATR complex are perpendicular to the vertical axis of the cavity probably acting as a steric plug toward the matrix as hypothesized previously [5]. We can propose that mutations of M254 or M256 to alanine would modify the size of this plug, altering the cavity geometry, inhibiting ATR-binding and thus probably adenylic nucleotides binding. Our results are in agreement with the recent characterization of two new members of the MCF, i.e. ADNT1 from *Arabidopsis thaliana* [34] and SLC25A42 from Human [35]. Indeed, in all the *adnt1* genes sequenced, the RRRMMM motif is replaced with RRRMQM showing that the methionyl residue in the central position of the triplet was not essential to the ADP/ATP transport activity. However, the ADNT1 carrier was shown to transport in reconstituted systems adenylic nucleotides such as ATP and dATP, and, to a lesser extend, ADP, dADP, but also AMP and dAMP. Besides, CATR, the powerful inhibitor of the Ancp, was less effective on the reconstituted ADNT1 transport activity and BA had no effect. The



other carrier, SLC25A42, showed in reconstituted system a high transport affinity for adenylic nucleotides derivatives such as coenzyme A and adenosine 3'-5'-diphosphate and to a lesser extent for AMP, ADP and ATP [35]. Interestingly, in all the *SLC25A42* genes, only the RRRM part of the motif was conserved. Moreover, though BA had some inhibitory effect on ADP/ATP exchange catalyzed by the SLC25A42 carrier, CATR had little effect. Thus, these results strengthen our idea that the methionyl residues of the triplet could participate to the atractyloside-binding and to the ADP/ATP-binding but suggest also a role in the selectivity of the adenylic nucleotides carried across the cavity. Finally, these residues could contribute to the high specificity of Ancp towards ADP and ATP.

Variants of ScAnc2p that could not grow on YPL were subjected to selection for spontaneous suppressors. No suppressor was obtained with the *scanc2/MMA*, *scanc2/AAM*, *scanc2/AMA*, *scanc2/MAA* and *scanc2/AAA* strains suggesting a major structural and/or functional alteration of the corresponding carriers expressed. Contrariwise, emergence in YPL of second site suppressors explained the revival of growth observed with *scanc2/AMM*. Thus, the M254A mutation located toward the matrix propagates a structural perturbation which can be suppressed on the far side of the carrier toward the IMS, as much distant as 225 amino acids away from the parental mutation in the case of the G29C mutation. There is a discernable pattern in the mutations. Nine of these changes occur in amino acid residues that are very well conserved in Ancp (G29, A101, F104, A105, Y206, G208, G297, A298S) [4] and analyses of the mutations show the importance of particular amino acids with -OH groups (A101T, A105T, G208S, G297S, A298S and I301T) or -SH group (G29C) to restore ADP/ATP transport activity (Table 3). Interestingly, similar results were obtained with mutants of the arginyl residues of the motif RRRMMM selected for spontaneous suppressors [32]. Mutation of R252 and 253 in isoleucine (R252I and R253I, respectively) gave a large number of second site suppressors while R251I gave none [32]. So surprising, nine of these changes (G29C, S32N, F104L, A105T, Y206H, G208S, A298S, I301T and L307P) also occur in ScAnc2p^{AMM} revertants. Consequently, mutating residues R252, R253, and M254 of ScAnc2p in hydrophobic amino-acid residues, gives the same second site suppressors suggesting ultimately a similar biochemical role in the ADP/ATP transport. Interestingly, all these amino acids appear at homologous locations in the part toward the IMS of the putative transmembrane segments (TMS) 1, 2, 4 and 6 of ScAnc2p. Two second site suppressors in TMS 5 reverted also mutation R253I [32] while mutation M254A seems to give none in this part of the carrier. The analysis of a larger number of clones would have probably identified these two other suppressors in our study. Among the second site mutations obtained in this

work, one of them was particularly interesting: L307P. This mutation is localized in the C-terminal extremity of ScAnc2p which is also involved in nucleotide recognition and binding step as was shown recently in our laboratory [16]. Thus, it is obvious that mutation L307P localized outside the cavity affects the conformational state of the C-terminal extremity of the carrier by offsetting the negative perturbation induced by the M254A mutation, making possible the nucleotide-binding. This phenomenon could also demonstrate the cooperativity between regions of the carrier distant from each other which would be involved in ADP/ATP-binding step.

In conclusion, despite that they share 47% sequence identity, we have shown that the yeast and the bovine carriers in detergent solution present significant differences in their conformational dynamics. Indeed, unlike bAnc1p, ScAnc2p is distinguished by the lower deuterium exchange of the upper part of its cavity toward the IMS whatever the inhibitor used. But, as shown for the bovine carrier, the conformational changes occurring between both conformations affect the yeast carrier in its entirety. Second, focusing our studies on the triplet of methionyl residues in the RRRMMM sequence, common to all the Ancp, we demonstrated that the differences in deuterium exchange of this region of the carrier complexed to either CATR or BA can be linked to the functional dynamics of ScAnc2p. We hypothesize that the methionine triplet would contribute to the ADP/ATP-binding step. The fact that a mutation located at the bottom of the cavity toward the matrix can be compensated for a second mutation on top of the cavity toward the IMS suggests a real synergy between each side of the carrier during the transport mechanism of nucleotides. Moreover, the existence of many second site mutations that restore protein function highlights that the cavity of Ancp is a dynamics structure strengthening the results obtained in HDX-MS experiments.

## Acknowledgements

Benjamin Cléménçon and Martial Rey are supported by fellowships from the Région Rhône-Alpes and the Université Joseph Fourier (UJF), respectively. This work was supported by grants from the UJF, the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA).

## Keywords

ADP/ATP carrier, carboxyatractyloside, BA, mitochondria, yeast, hydrogen/deuterium exchange, conformational dynamics.

## Abbreviations

The abbreviations used are: CATR, carboxyatractyloside; ATR, atractyloside; BA, bongkreikic acid; IMS, intermembrane space; DDM, *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside; GndCl, guanidinium chloride; HRP, horseradish peroxidase; HTP, Hydroxylapatite; BSA, bovine serum albumin; ADP/ATP carrier, Ancp; bAnc1p, bovine isoform 1 ADP/ATP carrier; yeast isoform 2 ADP/ATP carrier, ScAnc2p; ScVDAC1, isoform one of the yeast mitochondrial porin; HDX, hydrogen/deuterium exchange; ESI, electrospray ionisation; ToF, time of flight; LC, liquid chromatography

## Legends

**Fig.1:** Analysis of the primary amino acid sequence of ScAnc2p and proteolysis in HDX compatible conditions. **A**, Analyses in LC ESI-ToF-MS of ScAnc2p-(His₆) in 0.05% (w/v) DDM solution. Inset: Deconvoluted spectrum of the carrier purified from crude mitochondrial extracts of *JLI-3 ANC2(His₆)* strain and analyzed by SDS-PAGE (12.5% acrylamide) then revealed by Coomassie Blue staining. MW: Molecular weight markers. **B**, Purification of ScAnc2p from crude mitochondrial extracts of *JLI-3ANC2* (line 1) or *JLI-3 $\Delta$ por1-ANC2* (line 2) strains analyzed by SDS-PAGE as described in **A**. **C**, Proteolysis of ScAnc2p. Pepsin, and type XVIII proteases were tested and corresponding lysates were analyzed by SDS-PAGE as in **A** and revealed by Western-blot with anti-ScAnc2p. Digestion assays are performed with 2  $\mu$ g of ScAnc2p at a substrate/protease ratio of 1:0.25 to 1.1 (w/w) for pepsin and 1:1.5 to 1:24 (w/w) for type XVIII protease in acidic buffer during 2 min at 4°C. Identified polypeptides (ScAnc2p, ScAnc2p-(His₆) and ScVDAC1) are indicated by arrowheads.

**Fig.2:** HDX profile of ScAnc2p complexed to CATR or to BA mapped to its sequence after exchange time of 10 s, 30 s, 100 s, 300 s, 1000 s, 3000 s and 10000 s. The deuterium levels of each segment at each time-point are shown by different colours from purple ( $\leq 10\%$

deuteration) through maroon ( $\leq 90\%$ ), as indicated on the bellow of the figure. Putative transmembrane helices (H1 to H6), matrix loops (m1, m2 and m3) encompassing matrix helices (h12, h34 and h56) and IMS loops (C1 and C2) are deduced from the 3D-structure of the bovine carrier complexed to CATR [5] and are represented above the sequence.

**Fig. 3:** Yeast growth phenotype associated with methionyl residue mutations of the triplet RRR. *JL1Δ2Δ3u⁻* strain was transformed with plasmid pRS314 containing no gene (line 1), the wild-type *ScANC2* gene (line 2), or the various *Scanc2* mutated genes (lines 3-9) of which the three methionyl residues in ScAnc2p were mutated into alanyl residues, simultaneously (*Scanc2/AAA*), in pairs (*Scanc2/AAM*, *Scanc2/AMA*, *Scanc2/MAA*) or one at a time (*Scanc2/AMM*, *Scanc2/MAM*, *Scanc2/MMA*), under the control of *ScANC2* regulating sequences. **A**, Yeast transformants were isolated and inoculated in liquid complete minimum medium free of tryptophan containing 2% glucose as carbon source (YNB Glc W⁻). When the cultures reached log phase, cells were diluted to obtain  $2.10^5$  to  $2.10^2$  cells per 4  $\mu$ L and then spotted onto YNB Glc W⁻ (glucose) or rich lactate-containing medium (YPL) plates and incubated 3 days (YNB Glc W⁻) or between 3 -7 days (YPL) at 28 °C. **B**, growth curves of strains *ScANC2*, *Scanc2/MAM* and *Scanc2/AMM* in liquid YPL-rich medium monitored by absorbance at 600 nm ( $A_{600nm}$ ) for approximately 45, 65 and 85 h, respectively. The cultures were inoculated with cells previously grown on YNB Glc W⁻ medium to obtain an initial  $A_{600nm}$  0.1. Except for *Scanc2/AMM* which was a reverted strain, values are the means of at least three independent experiments.

**Fig.4:** Location of second-site mutants on a 3D-model of ScAnc2p based on the template structure of bAnc1p complexed to CATR (PDB ID 1OKC) and generated using the programme server Protein Homology/analogY Recognition Engine (PHYRE, version 0.2) [36]. Modeling of the 3D-structure of ScAnc2p covers residues: 2-308. **A**, Ribbon diagram of the carrier viewed from the IMS. **B**, viewed from the side. Ribbon diagrams were drawn with the programs PyMOL v0.99, DeLano Scientific LLC. The metionyl residues at 254 (parental mutation), 255, 256 and arginyl residues 251 to 253 are indicated in orange and green, respectively. The 12 revertant mutations of M254A are shown in blue. The putative transmembrane segments H1, H2, H4, H6 and the C-terminal extremity (C-ter) encompassing the second-site mutants are indicated.

**Fig 5:** Relative mitochondrial content of wild type and mutated variants of ScAnc2p. Mitochondrial protein extracts (20 µg in each lane) prepared from wild type strain *JL-ScANC2* (lines 1 and 9) and variant strains lines 2 to 8, 10 and 11) growing under fermentable (lines 1 to 8) or no fermentable (lines 9 and 11) conditions, were subjected to SDS-PAGE (12.5% acrylamide) and Western blotting. Proteins were detected with polyclonal antibodies directed against SDS-treated Anc2p (1:1500 final dilution). As a standard, a quantification of ScVDAC1 using polyclonal anti-ScVDAC1 antibodies was performed (1:1000 final dilution). Immune complexes were detected with ECL. Identified polypeptides are indicated by arrows.

## References

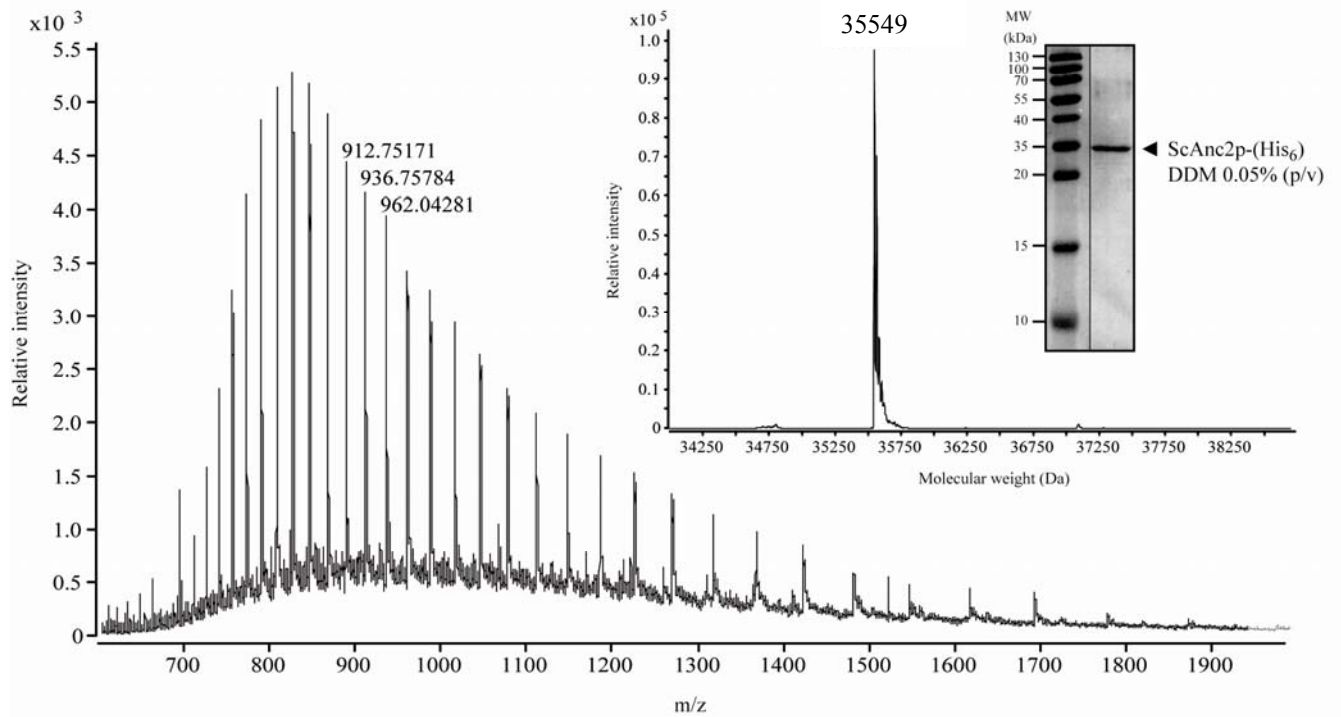
- [1] M. Klingenberg, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochim Biophys Acta* 1778 (2008) 1978-2021.
- [2] J.E. Walker, M.J. Runswick, The mitochondrial transport protein superfamily, *J Bioenerg Biomembr* 25 (1993) 435-446.
- [3] G. Brandolin, A. Le Saux, V. Trezeguet, P.V. Vignais, G.J. Lauquin, Biochemical characterisation of the isolated Anc2 adenine nucleotide carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria, *Biochem Biophys Res Commun* 192 (1993) 143-150.
- [4] C. Dahout-Gonzalez, H. Nury, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, E. Pebay-Peyroula, G. Brandolin, Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Physiology (Bethesda)* 21 (2006) 242-249.
- [5] E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, *Nature* 426 (2003) 39-44.
- [6] M. Rey, P. Man, B. Clemencon, V. Trezeguet, G. Brandolin, E. Forest, L. Pelosi, Conformational dynamics of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier isoform 1 revealed by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry, *J Biol Chem* (2010).
- [7] V. Trezeguet, L. Pelosi, G.J. Lauquin, G. Brandolin, The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects, *J Bioenerg Biomembr* 40 (2008) 435-443.
- [8] C. Dahout-Gonzalez, C. Ramus, E.P. Dassa, A.C. Dianoux, G. Brandolin, Conformation-dependent swinging of the matrix loop m2 of the mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier, *Biochemistry* 44 (2005) 16310-16320.
- [9] G. Brandolin, C. Meyer, G. Defaye, P.M. Vignais, P.V. Vignais, Partial purification of an atractyloside-binding protein from mitochondria, *FEBS Lett* 46 (1974) 149-153.
- [10] G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Interaction of (3H) bongkreikic acid with the mitochondrial adenine nucleotide translocator, *Biochemistry* 15 (1976) 2316-2322.
- [11] M. Rey, P. Man, G. Brandolin, E. Forest, L. Pelosi, Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 23 (2009) 3431-3438.
- [12] S.N. Cohen, A.C. Chang, L. Hsu, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 69 (1972) 2110-2114.

- [13] T. Drgon, L. Sabova, N. Nelson, J. Kolarov, ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Lett 289 (1991) 159-162.
- [14] C. De Marcos Lousa, V. Trezeguet, A.C. Dianoux, G. Brandolin, G.J. Lauquin, The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*, Biochemistry 41 (2002) 14412-14420.
- [15] C. Fiore, V. Trezeguet, P. Roux, A. Le Saux, F. Noel, C. Schwimmer, D. Arlot, A.C. Dianoux, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region, Protein Expr Purif 19 (2000) 57-65.
- [16] B. Clemençon, M. Rey, A.C. Dianoux, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, L. Pelosi, Structure-function relationships of the C-terminal end of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2, J Biol Chem 283 (2008) 11218-11225.
- [17] A. Le Saux, P. Roux, V. Trezeguet, C. Fiore, C. Schwimmer, A.C. Dianoux, P.V. Vignais, G. Brandolin, G.J. Lauquin, Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. 1. Tryptophanyl residues of the carrier can be mutated without impairing protein activity, Biochemistry 35 (1996) 16116-16124.
- [18] D. Gietz, A. St Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, Nucleic Acids Res 20 (1992) 1425.
- [19] E.P. Dassa, C. Dahout-Gonzalez, A.C. Dianoux, G. Brandolin, Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome c fusion protein, Protein Expr Purif 40 (2005) 358-369.
- [20] M. Rey, H. Mrazek, P. Pompach, P. Novak, L. Pelosi, G. Brandolin, E. Forest, V. Havlicek, P. Man, Effective removal of nonionic detergents in protein mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, and proteomics, Anal Chem 82 (2010) 5107-5116.
- [21] Z. Zhang, A.G. Marshall, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra, J Am Soc Mass Spectrom 9 (1998) 225-233.
- [22] M. Knirsch, M.P. Gawaz, M. Klingenberg, The isolation and reconstitution of the ADP/ATP carrier from wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of primarily one type (AAC-2), FEBS Lett 244 (1989) 427-432.
- [23] E. Majima, H. Koike, Y.M. Hong, Y. Shinohara, H. Terada, Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide, J Biol Chem 268 (1993) 22181-22187.
- [24] E. Majima, Y. Shinohara, N. Yamaguchi, Y.M. Hong, H. Terada, Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent eosin-5-maleimide, Biochemistry 33 (1994) 9530-9536.
- [25] F. Boulay, P.V. Vignais, Localization of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier protein, Biochemistry 23 (1984) 4807-4812.
- [26] G. Brandolin, F. Boulay, P. Dalbon, P.V. Vignais, Orientation of the N-terminal region of the membrane-bound ADP/ATP carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. Evidence that the accessibility of the N-terminal residues depends on the conformational state of the carrier, Biochemistry 28 (1989) 1093-1100.

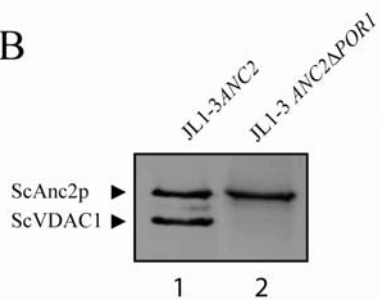
- [27] I. Marty, G. Brandolin, J. Gagnon, R. Brasseur, P.V. Vignais, Topography of the membrane-bound ADP/ATP carrier assessed by enzymatic proteolysis, *Biochemistry* 31 (1992) 4058-4065.
- [28] A.C. Dianoux, F. Noel, C. Fiore, V. Trezeguet, S. Kieffer, M. Jaquinod, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[beta-32P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry, *Biochemistry* 39 (2000) 11477-11487.
- [29] Y. Kihira, E. Majima, Y. Shinohara, H. Terada, Cysteine labeling studies detect conformational changes in region 106-132 of the mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry* 44 (2005) 184-192.
- [30] A. Iwahashi, Y. Kihira, E. Majima, H. Terada, N. Yamazaki, M. Kataoka, Y. Shinohara, The structure of the second cytosolic loop of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier AAC2 is dependent on the conformational state, *Mitochondrion* 6 (2006) 245-251.
- [31] G. Brandolin, A. Le Saux, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane, *J Bioenerg Biomembr* 25 (1993) 459-472.
- [32] D.R. Nelson, M.G. Douglas, Function-based mapping of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator by selection for second site revertants, *J Mol Biol* 230 (1993) 1171-1182.
- [33] D.R. Nelson, J.E. Lawson, M. Klingenberg, M.G. Douglas, Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator. Six arginines and one lysine are essential, *J Mol Biol* 230 (1993) 1159-1170.
- [34] L. Palmieri, A. Santoro, F. Carrari, E. Blanco, A. Nunes-Nesi, R. Arrigoni, F. Genchi, A.R. Fernie, F. Palmieri, Identification and characterization of ADNT1, a novel mitochondrial adenine nucleotide transporter from *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 148 (2008) 1797-1808.
- [35] G. Fiermonte, E. Paradies, S. Todisco, C.M. Marobbio, F. Palmieri, A novel member of solute carrier family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme A and adenosine 3',5'-diphosphate in human mitochondria, *J Biol Chem* 284 (2009) 18152-18159.
- [36] L.A. Kelley, M.J. Sternberg, Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server, *Nat Protoc* 4 (2009) 363-371.

Fig. 1

A



B



C

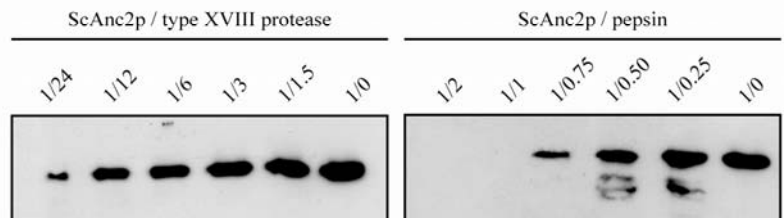




Fig. 2

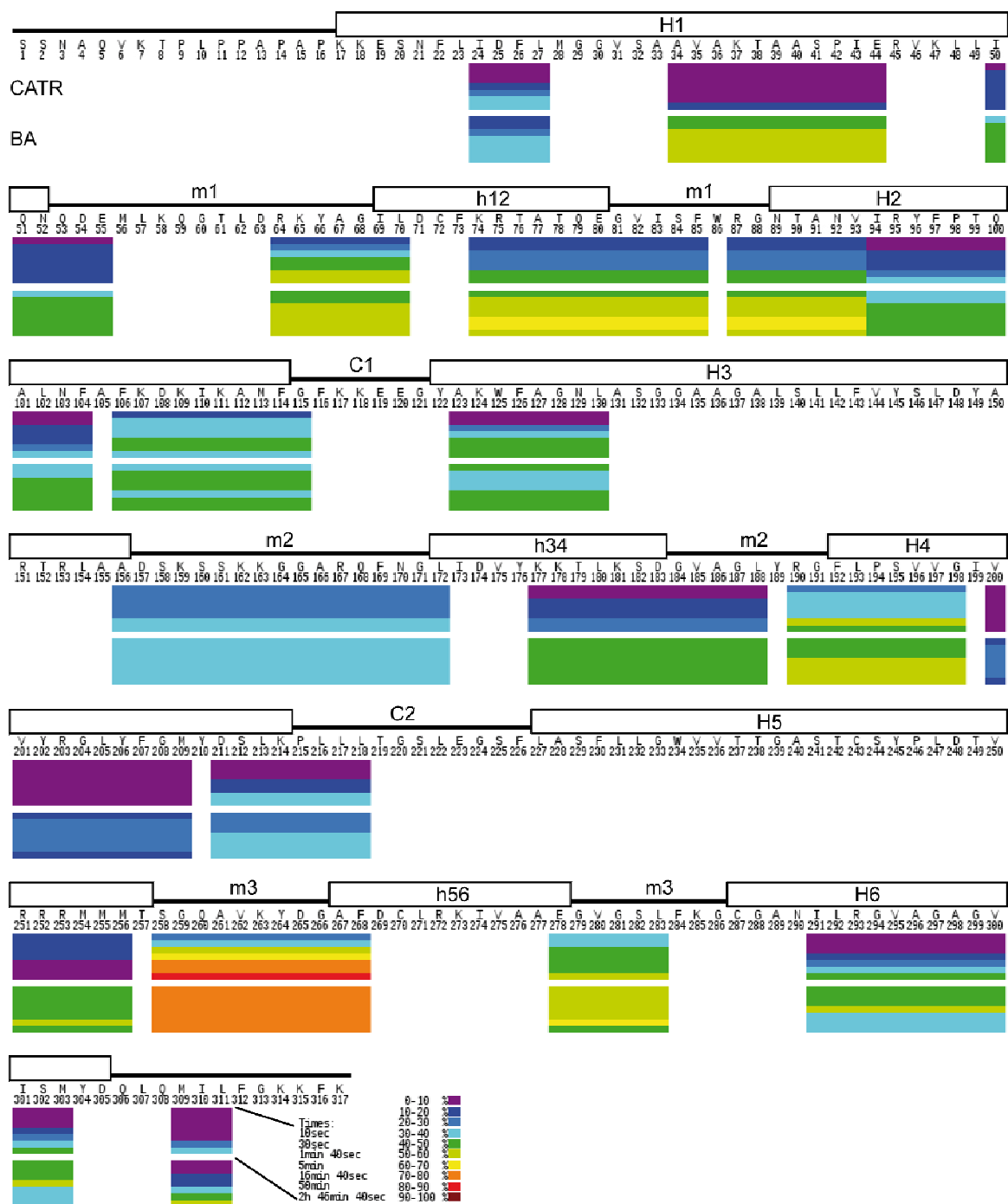
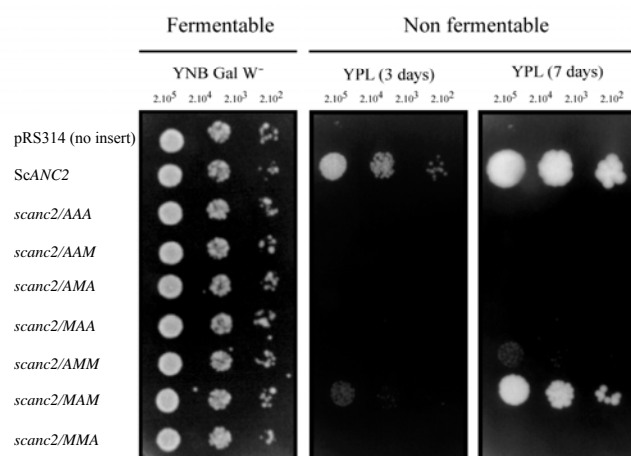


Fig. 3

A



B

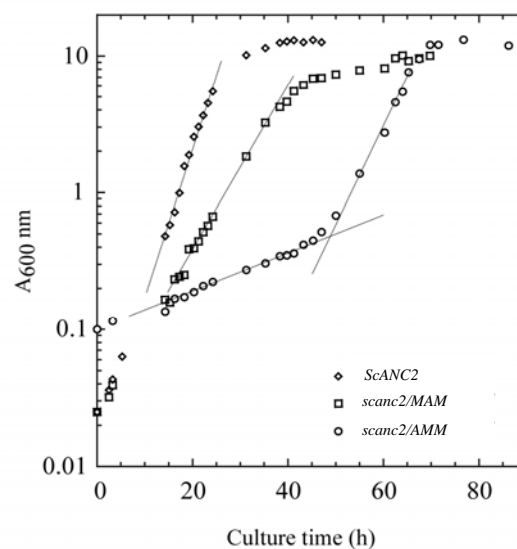
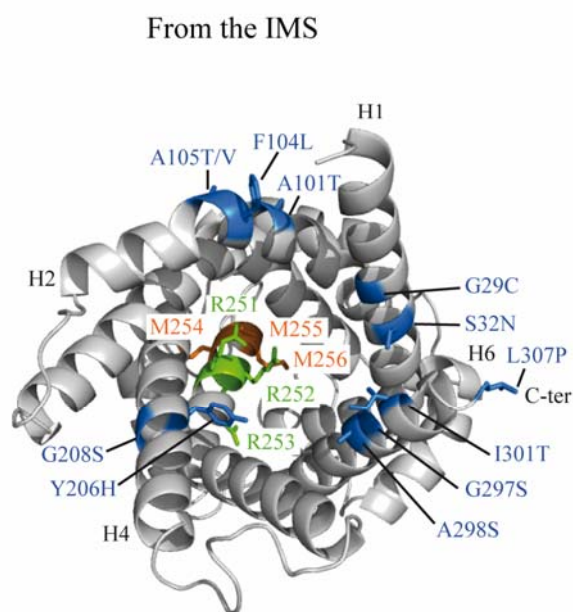


Fig. 4

A



B

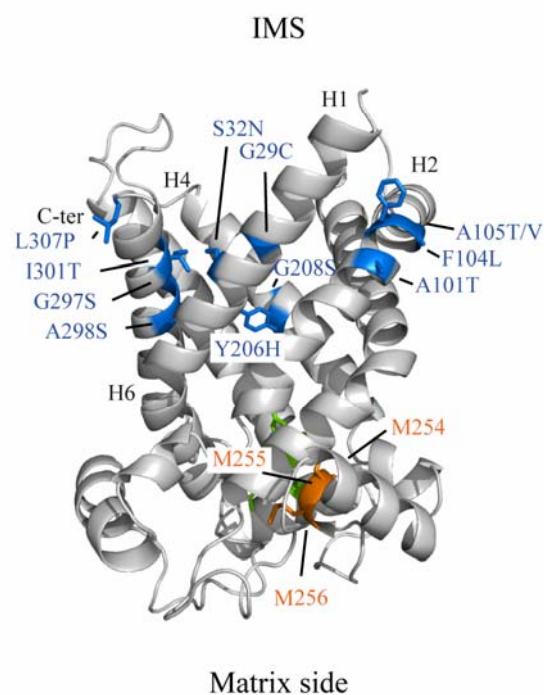
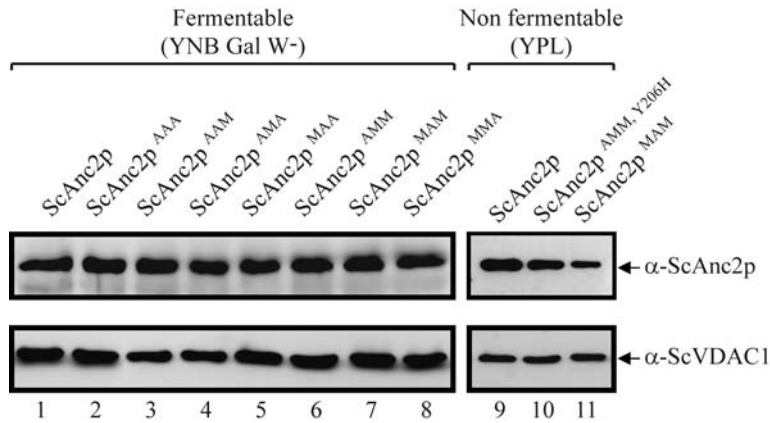


Fig. 5

**Table 1.** Strategy for site directed mutagenesis

Amino acid change	Oligonucleotides used ^a	Strain name ^b
M254A; M255A; M256A	AAA-Fw: gttagaagaagag <u>cg</u> g <u>cg</u> gacctccggtcaagct AAA-Rc: agcttgaccggaggtc <u>g</u> cc <u>g</u> ctcttcttctaac	<i>scanc2/AAA</i>
M254A; M255A	AAM-Fw: gttagaagaagag <u>cg</u> g <u>cg</u> atgacctccggtcaagct AAM-Rc: agcttgaccggaggtcatc <u>g</u> cc <u>g</u> ctcttcttctaac	<i>scanc2/AAM</i>
M254A; M256A	AMA-Fw: gttagaagaagag <u>cg</u> g <u>cg</u> acctccggtcaagct AMA-Rc: agcttgaccggaggtc <u>g</u> ccatc <u>g</u> ctcttcttctaac	<i>scanc2/AMA</i>
M255A; M256A	MAA-Fw: gttagaagaagaatg <u>cg</u> g <u>cg</u> gacctccggtcaagct MAA-Rc: agcttgaccggaggtc <u>g</u> ccgcatcttcttctaac	<i>scanc2/MAA</i>
M254A	AMM-Fw: gttagaagaagag <u>cg</u> gacatgacctccggtcaagct AMM-Rc: agcttgaccggaggtcatcatc <u>g</u> ctcttcttctaac	<i>scanc2/AMM</i>
M255A	MAM-Fw: gttagaagaagaatg <u>cg</u> gacatgacctccggtcaagct MAM-Rc: agcttgaccggaggtcatc <u>g</u> ccattcttcttctaac	<i>scanc2/MAM</i>
M256A	MMA-Fw: gttagaagaagaatg <u>cg</u> gacacctccggtcaagct MMA-Rc: agcttgaccggaggtc <u>g</u> ccatcattcttcttctaac	<i>scanc2/MMA</i>

^a The changed bases are underlined.^b Nomenclature of the *JL1Δ2Δ3u* strains carrying pRS314 harbouring a wild type or a mutated *ScANC2* gene under the control of *ScANC2* regulatory sequences

**Table 2.** Nomenclature of the *scanc2/AMM* mutants growing on a non-fermentable carbon source due to the emergence of compensatory second-site mutations in *scanc2/AMM* ORF. TMS: transmembrane segment

Revertant strains	ORF position	Condon changes	Amino acid changes	TMS location
<i>scanc2/AMM, G29C</i>	88	GGT→TGT	G29C	1
<i>scanc2/AMM, S32N</i>	98	AGT→AAT	S32N	1
<i>scanc2/AMM, A101T</i>	304	GCT→ACT	A101T	2
<i>scanc2/AMM, F104L</i>	315	TTC→TTG	F104L	2
<i>scanc2/AMM, A105T</i>	316	GCC→ACC	A105T	2
<i>scanc2/AMM, A105V</i>	317	GCC→GTC	A105V	2
<i>scanc2/AMM, Y206H</i>	619	TAC→CAC	Y206H	4
<i>scanc2/AMM, G208S</i>	625	GGT→AGT	G208S	4
<i>scanc2/AMM, G297S</i>	892	GGT→AGT	G297S	4
<i>scanc2/AMM, A298S</i>	895	GCT→TCT	A298S	6
<i>scanc2/AMM, I301T</i>	905	ATC→ACC	I301T	6
<i>scanc2/AMM, L307P</i>	923	CTG→CCG	L307P	Cter

**Table 3:** Ligand-binding data to the carriers and kinetic parameters for ADP/ATP transport activity of mitochondria isolated from the strains *ScANC2* or *scanc2/MAM*

Strains	<i>ScANC2</i>	<i>scanc2/MAM</i>
<i>[³H]-ATR binding</i> ^a		
$B_{\max}$ pmol/mg proteins	$680 \pm 80$	$205 \pm 36$
$K_d$ (nM)	$375 \pm 44$	$1130 \pm 155$
<i>ADP/ATP exchange</i> ^b		
$V_{\max}$ (nmol ATP/min/mg prot.)	$1080 \pm 127$	$247 \pm 135$
$k_{\text{cat}}$ (min ⁻¹ )	$1538 \pm 214$	$1205 \pm 497$
$K_M$ external ADP (μM)	$3.7 \pm 2.0$	$12 \pm 1$

^a [³H]-ATR-binding parameters are averaged from three independent experiments. Number of binding sites  $B_{\max}$  and  $K_d$  values were calculated from Scatchard plots of [³H]-ATR-binding data.

^b  $V_{\max}$  and apparent  $K_m$  for external free ADP were calculated from kinetic data by using the Michaelis-Menten equation.  $K_{\text{cat}}$  refers to the turnover number calculated with the carrier content obtained from [³H]-ATR-binding experiments, assuming that 1 mol of ATR binds to 1 mol of transport unit. Values are the averages of three independent experiments.

## B. Résultats non publiés

### **Premiers résultats sur l'étude en HDX-MS de l'accessibilité au solvant du transporteur de phosphate mitochondrial (PiC) de *S. cerevisiae***

Certains peptides relativement intenses n'ont pas pu être attribués au transporteur d'ADP/ATP mitochondrial de levure lors de son analyse en SM tandem après digestion sur une colonne de pepsine. Une recherche automatique *via* le logiciel Mascot a permis d'assigner ces peptides à une autre protéine de la membranaire interne mitochondriale copurifiant avec ScAnc2p par chromatographie sur une colonne d'HTP (Brandolin *et al.*, 1993). Il s'agit du transporteur de phosphate ou PiC. Les transporteurs PiC et ScAnc2p appartiennent à la MCF et partagent 20,4% d'identité de séquence (**Figure III.1.4**). Les résultats encourageant obtenus en SM avec le PiC qui est minoritaire dans nos préparations de ScAnc2p, peuvent s'expliquer par une très bonne désorption des peptides générés lors de sa protéolyse par la pepsine.

#### **B.1 L'accessibilité au solvant du transporteur PiC est insensible au CATR et au BA**

L'analyse en HDX-MS du transporteur de levure PiC a constitué dans nos expériences un très bon contrôle interne vis-à-vis de la spécificité des inhibiteurs CATR et BA et par conséquent de leurs effets sur la dynamique conformationnelle du transporteur ScAnc2p. Par exemple, la région peptidique 158-168 (**Figure III.1.5A**) appartenant au transporteur PiC présente la même accessibilité au solvant quels que soient les inhibiteurs utilisés (CATR ou BA), contrairement à la région peptidique 74-85 issue de ScAnc2p qui est sensible à leur présence (**Figure III.1.5B**). Un résultat similaire a été obtenu pour l'ensemble des peptides issus du PiC et analysables en HDX-MS.

```

ScAnc2p      1 SSNAQVKTPLPPAPAPKKESNFLIDFLMGGVSAAVAKTAASPIERVKLLI
                ||      |:::  | | :      ::  ||: || |
PiC          1 -----SVSAAPAIPQYSVSDYMKFALAGAIGCGSTHSSMPIDVVKTRI

ScAnc2p     51 QNQDEMLKQGTLD RKYAGILDCFKRTATQEGVISFWRGNTANVIRYFPTQ
                | : : :      |::  ||:  || :  |      :: |
PiC         45 QLEPTVYNK-----GMVGSFKQIIAGEGAGALLTGFGPTLLGY-----

ScAnc2p    101 ALNFAFKDKIKAMFGFKKEEGYAKWFAGNLA-----SGGAAGA
                | : | | | : |:| ||      | || |
PiC         83 -----SIQGAFFKGGYEVFKKFFIDNLGYDTASRYKNSVYMGSAAAMA

ScAnc2p    139 --LSLLFVYSLDYARTRLAADSKSSKKGGARQF--NGLIDVYKTKLSDGV
                | : : : | : | || :      || |||: : : || :|:
PiC        125 EFLADIALCPL EATRIRLV SQP-----QFANGLVGGFSRILKEEGI

ScAnc2p    186 AGLYRGFLPSVVGIVVYR-----GLYFGMYDSLKPLLLTGSLEG
                | || | : : |      |:|      : | | :
PiC        166 GSFYSGFTPI LFKQIPYNI AKFLVFERASEFYGFAGPKEL SSTSTT--

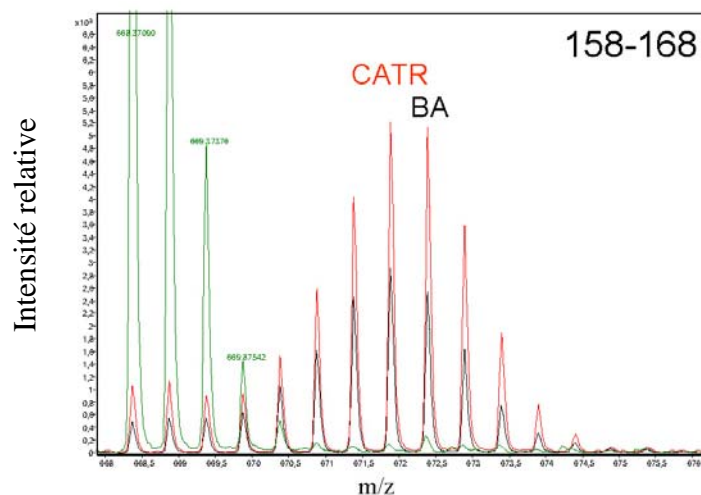
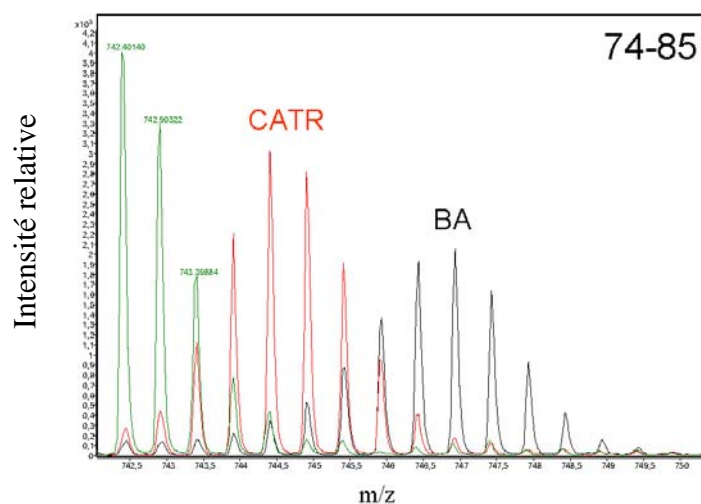
ScAnc2p    225 SFLASFLLGWVVTTGASTCSYPLDTVRRRMMMTS---GQA-----
                | : | | | : | | ||: :: |      ||:
PiC        214 --LLNLLSGLTAGLAAAIVSQPADTLLSKVNKTKKAPGQSTVGLLAQLAK

ScAnc2p    262 -VKYDGA FDC LRKIVAAEGV-----GSLFK--GCGANILRGVAGAG
                : : |:| | : |      |||      || | | |
PiC        262 QLGFFGSFAGLPTRLVMVGTLTSLQFGIYGS LKSTLGCPPTIEIGGGGH-

ScAnc2p    300 VISMYDQLQMILFGKKFK      317
PiC        310 -----      310

```

**Figure III.1.4 : Alignement des séquences des transporteurs ScAnc2p et PiC (isoforme 1) de la levure *S. cerevisiae*.** L'alignement des séquences de ScAnc2p (Swiss-Prot P18239) et du PiC (Swiss-Prot P23641) a été réalisé avec le programme *Needle*. Les barres repèrent les acides aminés identiques ; les deux points les résidus homologues. La numérotation des acides aminés fait référence à la séquence du transporteur d'ADP/ATP. Les deux séquences présentent 20,4% d'identité.

**A****B**

**Figure III.1.5 :** Spectre de masse obtenus en ESI-ToF-MS avant (vert) et après deutération de régions peptidiques caractéristiques du transporteur PiC et du transporteur ScAnc2p après incubation en présence de CATR (Rouge) ou de BA (noir). Pour exemple : (A) Région 158-168 du PiC ; (B) Région 74-85 du transporteur d'ADP/ATP. La deutération de la région peptidique 158-168 appartenant au PiC est insensible à la présence de CATR ou de BA. A l'inverse, celle de la région peptidique 74-85 de Scanc2p l'est. Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres régions peptidiques analysables du PiC. Les seules variations observées concernent ScAnc2p illustrant la spécificité de différences observées avec ce transporteur.



## B.2 Premier résultats sur l'accessibilité au solvant du transporteur PiC en HDX-MS

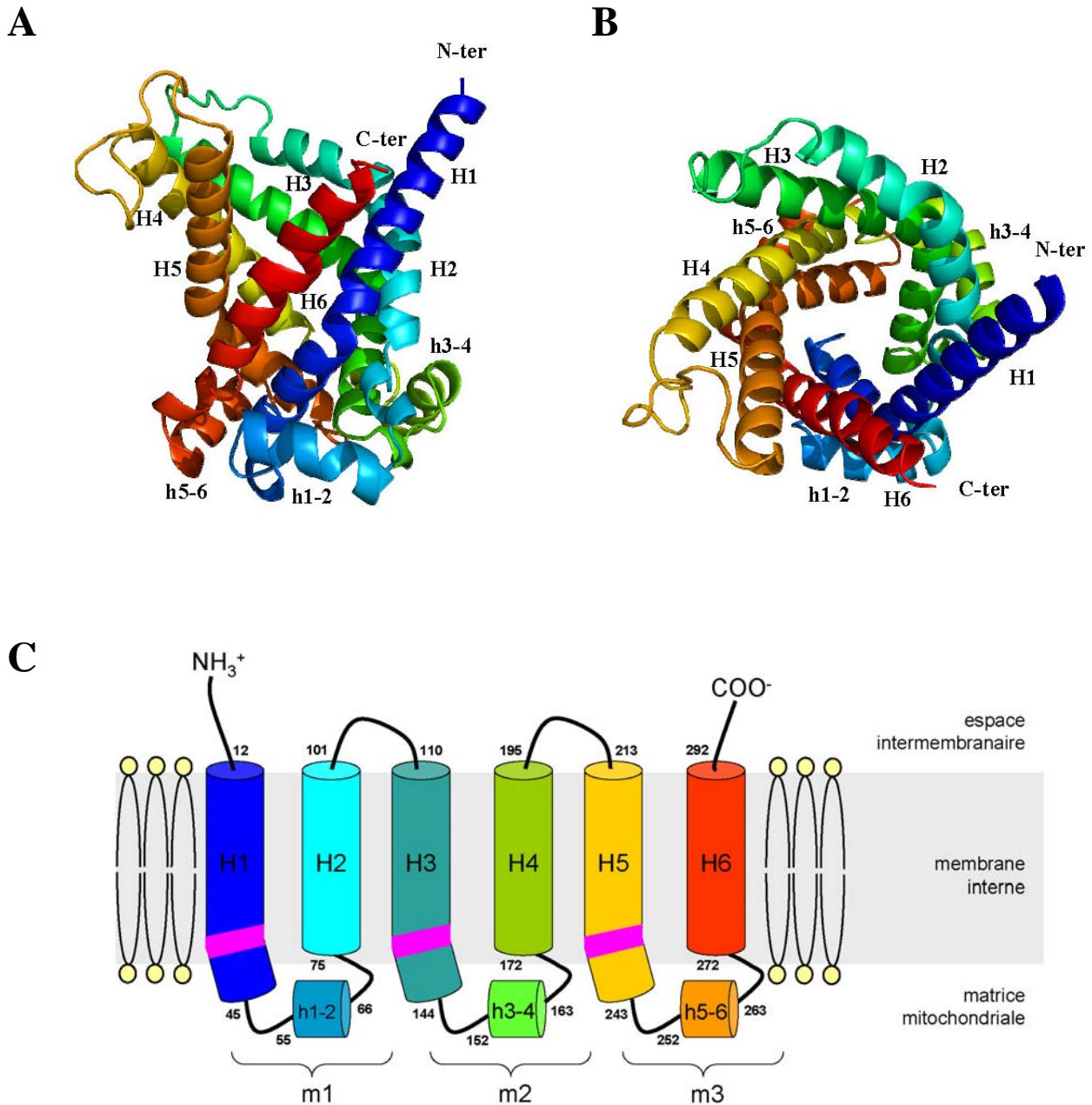
Parmi les 15 peptides identifiés en SM tandem (45% de recouvrement), 11 d'entre eux ont pu être analysés en HDX-MS, soit un recouvrement final de 36% (**Figure III.1.6**). En parallèle, une modélisation du transporteur de levure PiC a été réalisée à partir de la structure de l'Ancp bovin inhibé au CATR. Deux logiciels ont été testés : ESyPred 3D et PHYRE. Ce dernier a donné les meilleurs résultats (**Figure III.1.7**), permettant ainsi de positionner les régions peptidiques analysables en HDX-MS sur une structure putative du transporteur PiC de levure. Les zones ainsi couvertes correspondraient aux hélices transmembranaires H2, H4 et H5 et aux boucles matricielles m1, m2 et m3 (**Figure III.1.8**).

L'analyse en HDX-MS de certaines régions peptidiques montre à 20°C l'existence de doubles enveloppes qui suivent une cinétique de deutération de type EX1 caractéristique de plusieurs populations protéiques se comportant différemment vis-à-vis de l'échange à l'inverse d'une cinétique de deutération classique de type EX2 associée à seule population: c'est le cas des régions 61-81, 144-156, 158-168 (pour exemple, voir **Figure III.1.9**), 227-238 et 261-269. Ainsi, dans le cas des 3 premières, pour une même région peptidique, il est possible de distinguer une première enveloppe associée à une faible accessibilité au solvant (HDX < 20% après 10000s d'incubation) et au contraire une seconde enveloppe indiquant une accessibilité au solvant croissante et bien plus importante (HDX > 55% après 10000s d'incubation) (**Figure III.1.8**). D'après la structure 3D modélisée du transporteur PiC, il s'agit des régions localisées dans la partie matricielle de la protéine et plus particulièrement au niveau des boucles matricielles (**Figure III.1.8**).

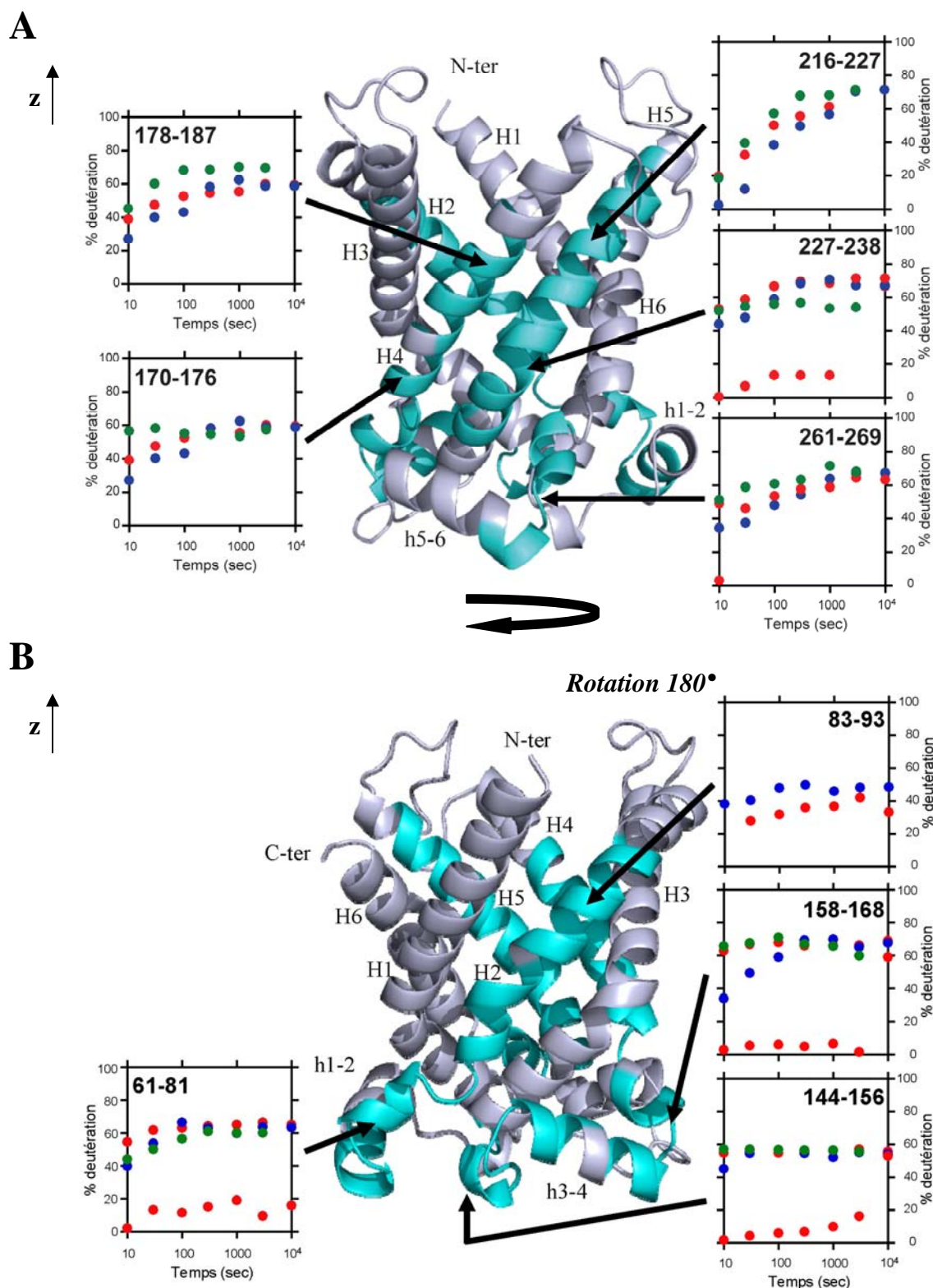
i) Il a d'abord été proposé que la présence de cette première enveloppe soient principalement associée à une forme dénaturée de la protéine. En effet, une agrégation du transporteur PiC, résultant de l'étape de concentration, pourrait masquer les régions peptidiques concernées et ainsi diminuer leur accessibilité au deutérium. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le transporteur PiC n'est pas inhibé dans nos conditions de deutération et donc probablement peu stabilisé en solution, contrairement aux expériences réalisées sur le transporteur ScAnc2p complexé soit CATR soit au BA. Afin de le vérifier, deux autres expériences ont été réalisées. La première concerna une deutération du transporteur PiC suivie à 0°C et non plus à 20°C pour mieux préserver la protéine au cours de l'expérience. La seconde est basée sur l'utilisation d'un inhibiteur, le NEM qui se fixe de façon covalente au résidu cystéine 28 au transporteur PiC dans les membranes (Wohlrab et Briggs, 1994) ; suivie d'une deutération de la protéine inhibée à 20°C. Dans ces deux conditions, les doubles enveloppes disparaissent au

ESI-ToF: 113 of 310 ~ 36%  
Total: 113 of 310 ~ 36%

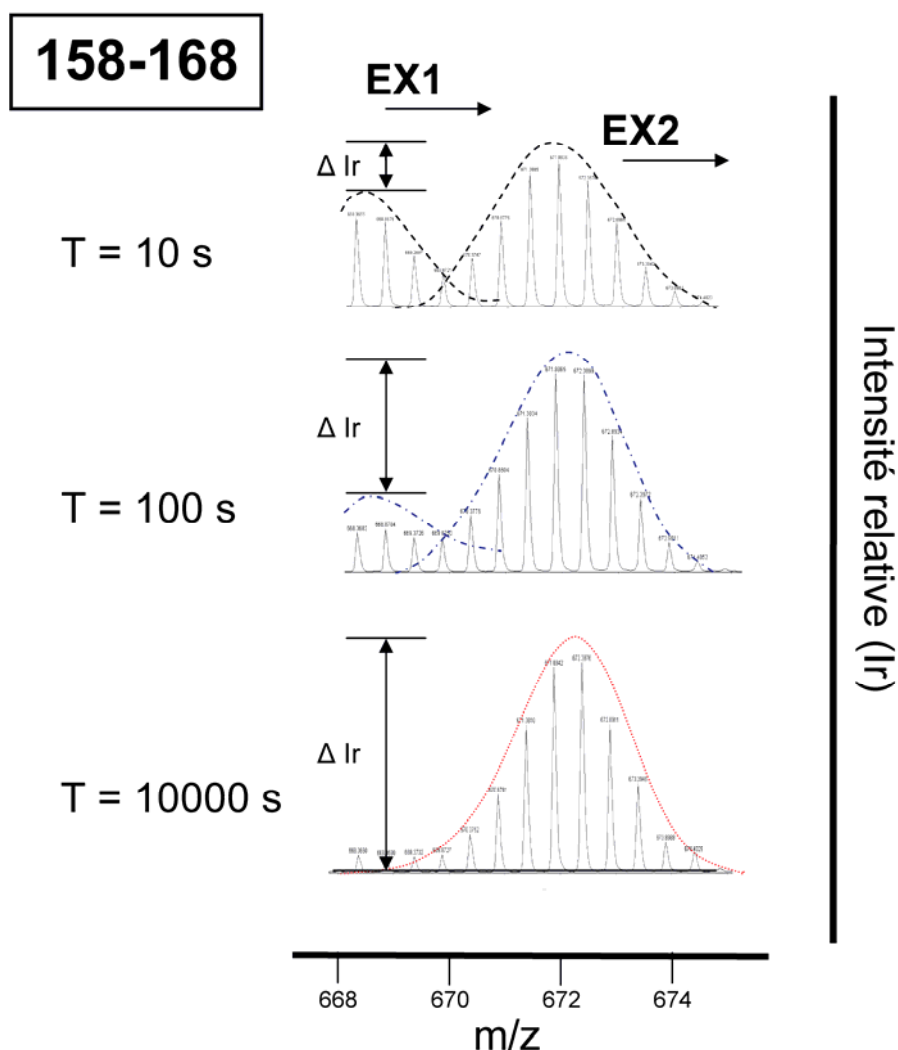
161



**Figure III.1.7 : Modélisation du transporteur PiC de levure à partir des données structurales du transporteur d'ADP/ATP bovin *via* le programme PHYRE.** (A) Vue latérale et (B) de l'espace intermembranaire de la structure putative. La chaîne polypeptidique est colorée du bleu au rouge, en allant de l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale. Les hélices intramembranaires (H1 à H6) et matricielles (h1-2, h3-4 et h5-6) sont indiqués. (C) Représentation schématique du transporteur PiC. Le positionnement présumé des éléments de structure secondaire d'après la séquence primaire en acide aminé est indiqué. m1, m2 et m3 correspondent aux boucles matricielles comprenant respectivement les hélices h1-2, h3-4 et h5-6.



**Figure III.1.8 : Cinétique de deutération des régions peptidiques du transporteur PiC analysées en LC-ESI-ToF-MS.** Le transporteur PiC a été modélisé à l'aide du logiciel PHYRE. (A) Vue latérale de la structure 3D par rapport à la membrane ; (B) après rotation de 180° suivant un axe vertical z. La cinétique de deutération obtenue pour chacune des régions peptidiques analysables en HDX-MS est représentée sous la forme d'un graphique (pourcentages de deutération par rapport au maximum théorique en fonction du temps exprimé en seconde). Les régions de la protéine qui ont été analysées sont colorées en bleu sur la structure présumée du PiC. Sont représentées en points rouges et en points bleus les cinétiques de deutération du PiC réalisées respectivement à 20°C et à 0°. Enfin, les cinétiques en points verts ont été obtenues à 20°C après traitement des extraits mitochondriaux en présence de NEM.



**Figure III.1.9 : Cinétique de deutération de la région peptidique 158-168 à 20°C après 10, 100 et 10000s d’HDX.** L’analyse en SM montre la présence de deux enveloppes isotopiques pour une seule et unique région. La première ( $m/z$  proche de 669) suit une cinétique de deutération du type EX1. Son intensité relative décroît au profit de la seconde enveloppe ( $m/z$  proche de 672) caractérisée par une cinétique de deutération EX2 classique.  $\Delta I_r$  : différence d’intensité relative entre les deux enveloppes. Des résultats similaires ont été obtenus avec les régions peptidiques 61-81, 144-156, 227-238 et 261-269.

## III.2 La porine de Levure VDAC (ScVDAC1)

### Etude *in vitro* de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 par échange HDX-MS

Il existe principalement deux grandes familles de protéines membranaires intrinsèques. La première concerne les protéines à hélices transmembranaires représentées dans notre étude par les membres de la MCF tel que le transporteur d'ADP/ATP. La seconde est illustrée par les protéines structurées dans la membrane en tonneaux  $\beta$  telles que les porines. Après avoir développé et mis en application avec succès l'HDX-MS pour l'étude *in vitro* de l'accessibilité au solvant des transporteurs mitochondriaux bovin et de levure localisés dans la membrane interne mitochondriale, nous avons appliqué cette méthode à l'analyse d'une autre protéine membranaire mitochondriale modèle insérée dans la membrane externe: la porine VDAC, en particulier l'isoforme 1 chez la levure *S. cerevisiae* (ScVDAC1). Par la suite, l'obtention de plusieurs structures 3D de la porine VDAC a donné une autre dimension à ce projet en permettant de discuter les résultats obtenus en HDX-MS par rapport à ceux publiés dans la littérature *via* les approches structurales.

#### III.2.1 Purification de la porine ScVDAC1 dans des conditions compatibles avec son étude en HDX-MS

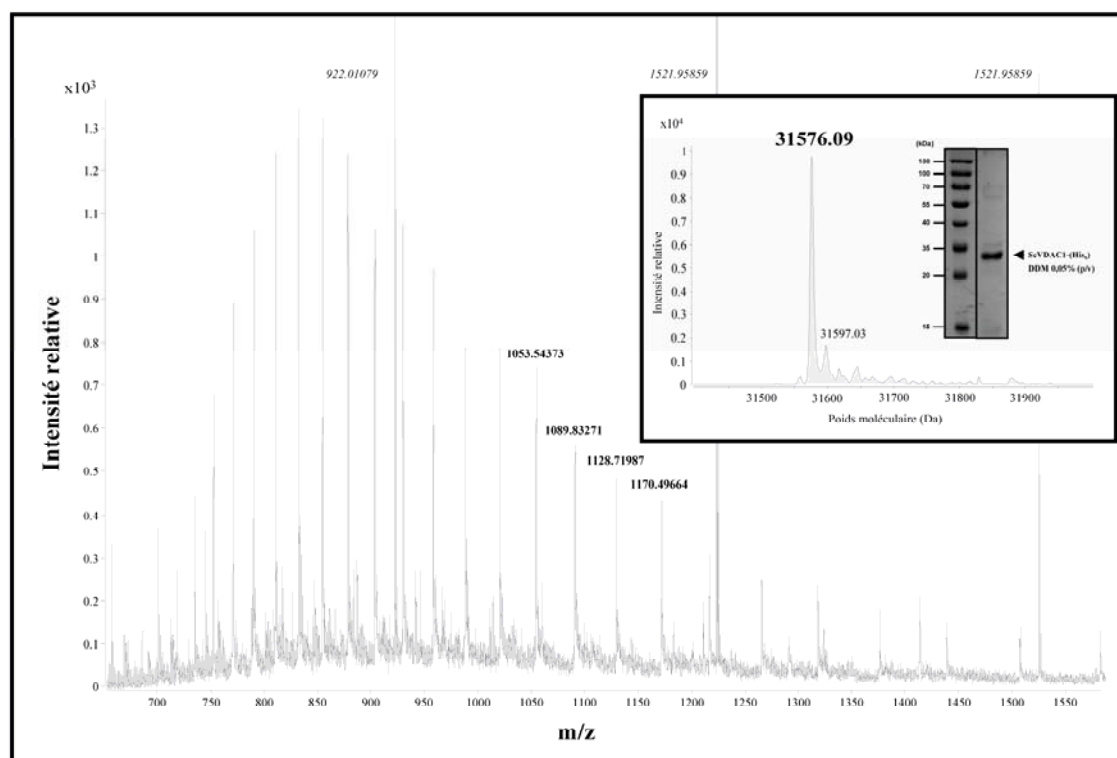
Cette étude est dans la continuité des travaux d'Agathe Spira, étudiante en Thèse de Doctorat dans notre laboratoire.

##### III.2.1.1 Détermination de la masse précise de ScVDAC1

Afin d'aborder l'étude de la porine ScVDAC1 en HDX-MS, la masse précise de la protéine purifiée a été déterminée en SM en vu de confirmer d'une part la séquence primaire en acide aminé, et d'autre part d'identifier la présence d'éventuelles modifications post-traductionnelles. Comme précédemment pour l'analyse du transporteur ScAnc2p (**voir Article 2**), la porine ScVDAC1 a été fusionnée du côté C-terminal à une étiquette polyhistidine (notée ScVDAC1-(His₆)), soit la séquence supplémentaire AAALHHHHHH, puis exprimée dans une souche de levure dépourvue de porine (**voir § II.1.1**). La masse attendue théorique est de 31707 Da. La



porine a ensuite été extraite de son environnement lipidique à l'aide d'HECAMEG (un détergent qui permet d'extraire cette protéine membranaire) puis purifiée en une seule étape de façon spécifique par chromatographie sur colonne d'HTP à l'aide de ce même détergent (**Figure III.2.1**). Afin de diminuer la concentration en détergent dans la fraction purifiée (voisine de 2% (p/v) finales), la porine étiquetée a été fixée sur une colonne de nickel puis éluée dans un minimum de DDM (0,05% p/v~cmc) après plusieurs lavages de la colonne dans ce même détergent. Cette concentration en DDM est suffisante pour conserver la protéine en solution. L'avantage du DDM est triple. Premièrement, il présente une cmc faible en milieu aqueux contrairement à l'HECAMEG (0,05 versus 0,5% (p/v), respectivement). Deuxièmement, son spectre de masse est très homogène contrairement à d'autres détergents utilisés tel que le Triton X-100. Enfin, son caractère hydrophile nous permet de le séparer aisément de la protéine membranaire sur une colonne C8 en phase inverse. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure III.2.1**. La masse précise mesurée pour la porine ScVADC1-(His₆) est de 31576,09 Da et correspond à la protéine étiquetée dépourvue de sa méthionine *N*-terminale.



**Figure III.2.1 : Détermination de la masse précise de ScVDAC1-(His₆) en solution de DDM 0,05% (p/v) par analyse en LC ESI-ToF-MS.** Encart : Spectre déconvolué de la porine purifiée à partir d'extract mitochondrial de la souche *V-HT* et son analyse par SDS-PAGE (12,5% acrylamide) après révélation au bleu de Coomassie

### III.2.1.2 Mise au point des conditions optimales d'extraction et de purification de la porine ScVDAC1

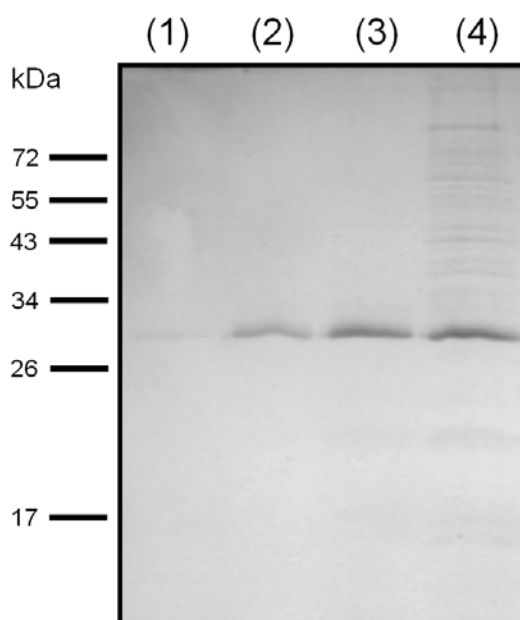
L'étude en HDX-MS de la porine ScVDAC1 sauvage a été préférée à celle étiquetée pour une seule et unique raison. Le premier objectif est de garder un état de la protéine *in vitro* le plus proche possible de celui natif. La présence de l'étiquette histidine aurait pu être une source de problème dans l'analyse futur des résultats. En effet, lorsque l'on se réfère à la structure 3D de la porine, l'extrémité C-terminale est relativement proche de celle N-terminale dont le rôle essentiel dans la fonction du pore n'est plus à démontrer (pour revue : (Colombini, 2009)). La purification de la porine ScVDAC1 a été précédemment mise au point à l'aide du détergent HECAMEG (Thèse de Agathe Spira 2007). Ce détergent est soluble dans le dichlorométhane et s'avère donc potentiellement compatible avec la technique d'analyse en HDX-MS développée récemment dans notre laboratoire (Rey *et al.*, 2010). Afin d'obtenir une protéine suffisamment concentrée (3-5 mg.mL⁻¹) en vu d'être diluée dans la solution de D₂O, le protocole de purification de la porine ScVDAC1 a été optimisé. Traditionnellement, la protéine est extraite de la membrane interne mitochondriale à l'aide d'HECAMEG puis purifiée par gravité par chromatographie sur une colonne d'HTP. Le principe de cette technique de purification repose principalement sur une rétention sur la colonne des protéines du lysat à l'exception de la porine solubilisée à l'aide d'HECAMEG. La concentration de la protéine purifiée après cette première étape varie de 0,02 à 0,05 mg.mL⁻¹. La porine est ensuite concentrée. Ce protocole est efficace mais cependant assez long (2h). Contrairement aux Ancp qui peuvent être stabilisés par la présence d'inhibiteurs spécifiques (CATR et BA), la porine est purifiée en l'absence de ligand. Nous avons donc envisagé que la celle-ci puisse être donc plus sensible à la dénaturation pendant l'expérience d'HDX qui dure approximativement 3h. Notre principal objectif a donc été de réduire son temps de purification et de concentration en vu de son analyse en HDX-MS.

Le principe de la purification reste le même, c'est-à-dire, un lysat de mitochondrie obtenu dans l'HECAMEG est déposé à la surface d'une colonne d'HTP. La porine est ensuite purifiée simplement par centrifugation de la colonne ou par pression du lysat sur la colonne à l'aide d'un piston. L'éluat obtenu en une seule étape (~1 min) contient la porine purifiée. Les **Figure III.2.2** et **III.2.3** illustrent les différentes conditions testées afin de purifier la porine concentrée dans un minimum de détergent. Différent rapport volume de colonne sur volume de lysat ont été testés (**Figure III.2.2**). Les meilleurs résultats ont été obtenus pour un rapport de 1. La porine est alors purifiée à une concentration de 0,35 mg.mL⁻¹ en une seule étape. De part les nombreux problèmes causés par les détergents en SM, nous avons également optimisé dans le lysat le

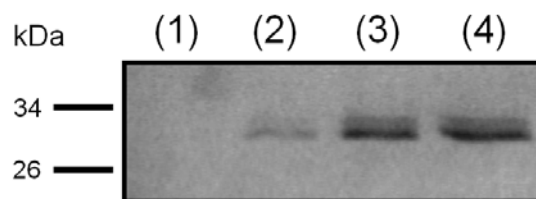


rapport quantité de détergent sur quantité de protéine totale tout en conservant une efficacité maximale d'extraction (**Figure III.2.3**). Un compromis a été obtenu pour un rapport de 5.

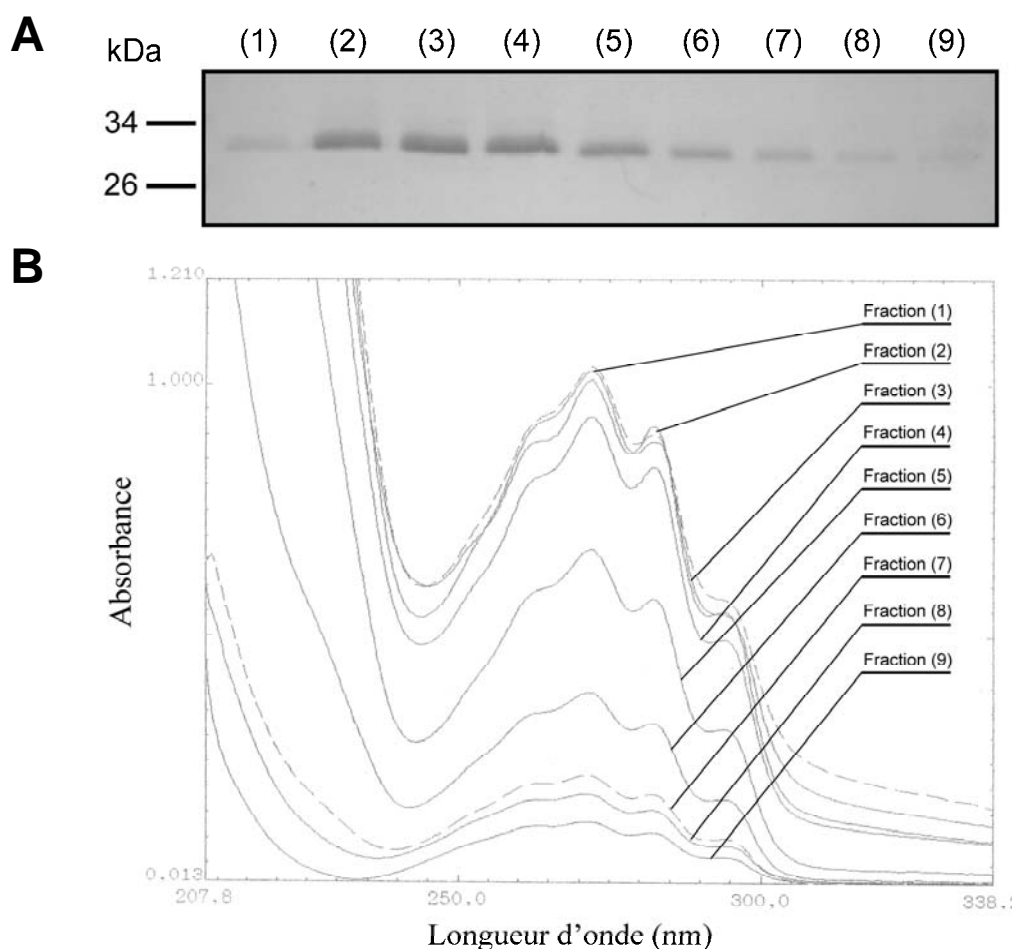
Cependant, les rendements de purification qui ont été estimés *via* cette méthode ne correspondaient pas à ceux précédemment mesurés *via* la purification sur colonne d'HTP par gravité. Ce problème est principalement lié à la rétention dans la colonne d'une partie de la porine non fixée qui est directement proportionnelle au volume mort de la colonne. Ce même volume mort dilue d'ailleurs également la fraction de porine éluée. Ce constat est illustré sur la **Figure III.2.4**. En utilisant un rapport volume de colonne sur volume de lysat de 2, le volume d'élution initialement obtenu après la première centrifugation correspond principalement au volume mort de la colonne. Sa concentration en porine purifiée est faible. L'ajout d'un volume supplémentaire de tampon d'élution correspondant au volume de lysat déposé sur la colonne permet d'éluer une majeure partie de la protéine extraite (non montré). Celle-ci est par contre diluée. En effet, la **Figure III.2.4A** montre que des ajouts successifs d'un volume de tampon d'élution correspondant seulement à 1/5 du volume de lysat déposé sur la colonne montrent que la porine est principalement éluée dans les 3 premières fractions (3/5 du volume de lysat) qui présentent une concentration en porine estimée à  $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ . En conclusion, ces dernières conditions ont été retenues pour la suite de l'étude.



**Figure III.2.2 : Purification en une seule étape de la porine ScVDAC1 en HECAMEG par chromatographie sur colonne d'HTP.** Les protéines présentes dans l'éluat obtenu après centrifugation du lysat mitochondrial sur la colonne d'HTP ont été séparées par SDS-PAGE (gel à 15%) puis colorées au bleu de Coomassie. Différent rapport volume de colonne d'HTP (Vcol) sur volume de lysat (Vlysat) ont été testés. (1) Vcol/Vlysat égale à 2, (2) Vcol/Vlysat = 1,5, (3) Vcol/Vlysat = 1 et (4) Vcol/Vlysat = 0,5. Dépôts : 10  $\mu\text{L}$  de lysat.



**Figure III.2.3 : Détermination du rapport minimal de la quantité de détergent (HECAMEG) sur la quantité de protéine dans le lysat mitochondrial à utiliser pour purifier la porine ScVDAC1 par chromatographie sur colonne d’HTP.** Les expériences ont été réalisées comme décrit dans la légende de la Figure III.2.2. Le détergent utilisé est l’HECAMEG ;  $V_{col}/V_{lysate} = 1$ . Analyse par SDS-PAGE (gel à 15%) des éluats obtenus après centrifugation du lysat mitochondrial sur la colonne d’HTP puis coloration au bleu de Coomassie. Différents rapport quantité de détergent/quantité de protéines (D/P) ont été testés : (1) (D/P) = 1, (2) pour D/P = 2,5, (3) pour D/P = 5 et pour D/P = 10. Dépôts : 10  $\mu$ L de lysat.



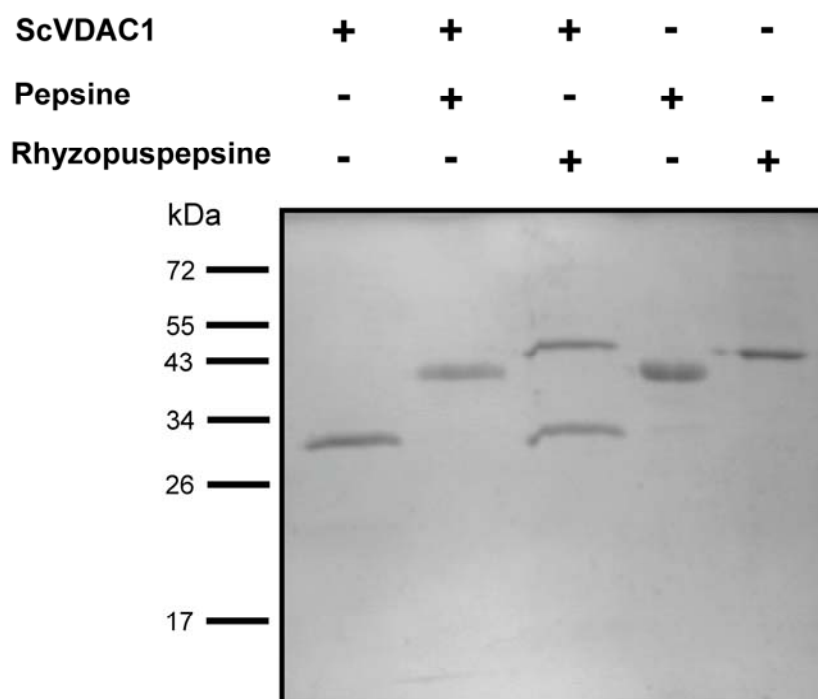
**Figure III.2.4 : Optimisation du protocole de purification de la porine ScVDAC1 en HECAMEG par chromatographie sur une colonne d’HTP.** Le détergent utilisé est l’HECAMEG, le rapport D/P est de 5 (voir Figure III.2.3) et le rapport  $V_{col}/V_{lysate}$  de 2 (voir Figure III.2.2). (A) Analyse par SDS-PAGE (gel à 15%) des éluats obtenus après centrifugation du lysat mitochondrial sur la colonne d’HTP puis coloration au bleu de Coomassie. (1) Centrifugation du lysat sur la colonne d’HTP; (2) à (9) lavage successif (par centrifugation) de la colonne d’HTP par un volume de tampon d’élution correspond à 1/5 du volume de lysat initialement déposé. On observe que la protéine sort concentrée dans les éluations 2 à 4 permettant d’obtenir une protéine concentrée à 0,7 mg/ml. Dépôts : 5  $\mu$ L de lysat. (B) Spectre d’absorbance de l’ergostérol présent dans les fractions d’élution de la colonne d’HTP.

### III.2.1.3 Dosage de l'ergostérol dans les fractions de porine ScVDAC1 purifiée

Nous avons pu vérifier qu'un lipide, l'ergostérol, copurifie avec la porine ScVDAC1. Sa présence est directement proportionnelle à la quantité de protéine purifiée dans les différentes fractions (**Figure III.2.4B**). Ce lipide n'est pas présent dans les fractions de ScAnc2p purifié par chromatographie sur colonne d'HTP (résultat non montré). Ainsi la présence de d'ergostérol semble être liée à celle de la porine ou tout du moins à un environnement membranaire solubilisé en HECAMEG correspondant à celui de la membrane externe mitochondriale.

### III.2.1.4 Détermination des conditions de protéolyse de la porine ScVDAC1p

Il existe d'autres contraintes inhérentes à la technique d'HDX (**voir § II.4**). En effet, le marquage est réversible, sensible au pH et à la température. Il est donc nécessaire de travailler dans des conditions acides et à froid. D'autre part, l'utilisation de protéases va nous permettre d'obtenir des peptides afin de localiser les deutériums incorporés dans la protéine. Plus les peptides seront de petites tailles, si possible se chevauchant, plus la résolution de l'analyse sera précise. Dans cet objectif, deux protéases actives à faible pH et à 4°C ont été testées. Il s'agit de la pepsine (commerciale) et de la rhizopuspepsine (ou protéase XVIII) préparée au laboratoire (Rey *et al.*, 2009). Cependant, ces protéases sont aspécifiques. Il a donc été nécessaire comme précédemment pour l'étude de ScAnc2p de réaliser au préalable une carte peptidique de la protéine afin d'identifier les peptides issues de la digestion en ESI-MSMS. L'activité de chacune des 2 protéases a été testée sur la porine dans des conditions compatibles avec l'analyse en HDX-MS. Les protéolyses ont ensuite été analysées en SDS-PAGE. L'analyse des profils électrophorétiques montrent sans équivoque que la pepsine est largement plus efficace dans la protéolyse de la porine ScVDAC1 que ne l'ait la rhizopuspepsine (**Figure III.2.5**). En effet, pour un rapport protéase/VDAC (p/p) de 1, la porine est complètement dégradée par la pepsine mais reste résistante à l'action de la rhizopuspepsine. Nous n'avons pas pu obtenir de meilleur résultat en augmentant le rapport rhizopuspepsine/VDAC. En conséquence, la pepsine sera donc la protéase de choix dans notre étude de la porine ScVDAC1 en HDX-MS. Il a précédemment été démontré l'efficacité et la reproductibilité des résultats de protéolyse obtenus lorsque la protéase d'intérêt est immobilisée sur une colonne directement mise en ligne dans le système d'analyse en SM des peptides deutérés (Rey *et al.*, 2009). Une colonne de pepsine immobilisée a donc aussi été utilisée dans notre approche.



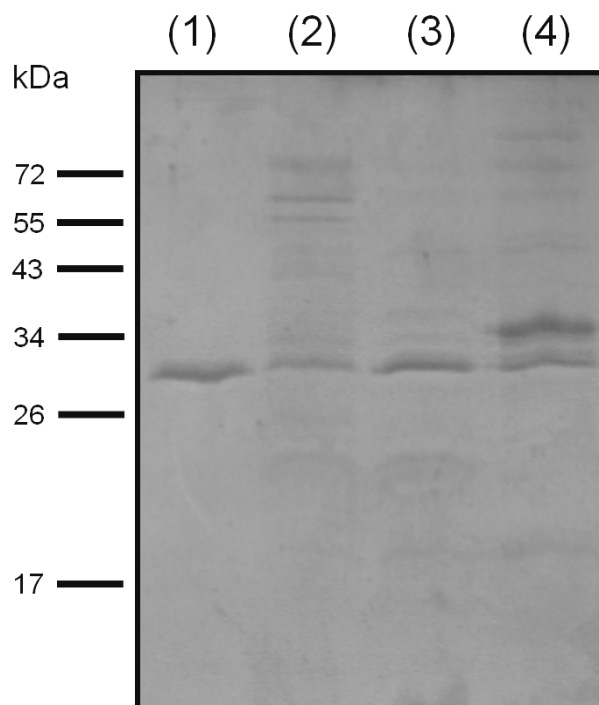
**Figure III.2.5 : Protéolyse de la porine ScVDAC1p en conditions acide et à basse température par la pepsine et la rhizopuspepsine.** Les produits de protéolyse ont été analysés par SDS-PAGE (gel à 15%) puis coloré au bleu de Coomassie. La présence (+) ou l'absence (-) de la porine, de la pepsine ou de la rhizopuspepsine dans les profils électrophorétiques est indiquée.

### III.2.1.5 Criblage de nouveaux détergents compatibles avec l'analyse en HDX-MS

La réussite de ce projet repose principalement sur les propriétés biochimiques et physico-chimiques du détergent utilisé pour extraire la protéine d'intérêt. En effet, celui doit permettre de purifier la porine par chromatographie sur colonne d'HTP et d'être facilement éliminable par le dichlorométhane (voir **Partie II**, § 2.4.3). Les expériences préliminaires réalisées sur la porine purifiée et digérée par la pepsine en présence d'HECAMEG ont montré une incompatibilité de ce détergent avec le protocole lié à son élimination à l'aide de dichlorométhane mis au point précédemment dans l'équipe (Rey *et al.*, 2010). Une mauvaise solubilité de l'HECAMEG dans ce solvant organique a été suggérée.

En conséquence, d'autres détergents appartenant à différentes familles ont été criblés. Il s'agit en outre du LAPAO (aminoxide), du C₈E₄ (polyoxyéthylène éther ou POE linéaire) et du Triton X-100 (POE aromatique). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus à l'aide d'HECAMEG. Le profil électrophorétique de la **Figure III.2.6** montre que seuls les détergents HECAMEG et C₈E₄ sont capables d'extraire et de purifier la porine de levure par chromatographie sur colonne

d’HTP. En effet, de nombreux contaminants copurifient avec le VDAC après solubilisation des extraits mitochondriaux à l’aide de LAPAO ou de Triton X-100. L’analyse en LC-ESI-ToF-MS d’échantillons contenant de fortes concentrations en  $C_8E_4$  traités au dichlorométhane a montré la très grande solubilité de ce détergent dans ce solvant organique. Son seul inconvénient reste d’ordre économique. Ainsi, les mises au point ont été réalisées avec un POE de la même famille moins onéreux et tout aussi soluble dans le dichlorométhane, le  $C_{10}E_6$ . Cependant, les manipulations déterminantes ont été réalisées en purifiant la porine VDAC à l’aide de  $C_8E_4$ .

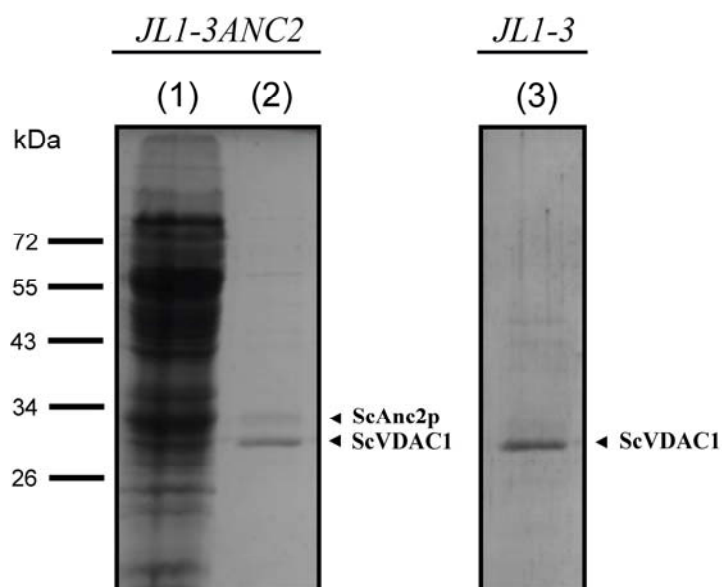


**Figure III.2.6 : Criblage de détergents compatibles avec l’analyse en HDX-MS de la porine ScVDAC1.** Les expériences ont été réalisées comme décrit dans la légende de la Figure III.2.3 ( $V_{col}/V_{lysate} = 1$  ;  $D/P = 1$ ). Analyse par SDS-PAGE (gel à 15%) des éluats obtenus après centrifugation du lysat mitochondrial sur la colonne d’HTP puis colorés au bleu de Coomassie. (1) lyse en HECAMEG, (2) en LAPAO, (3) en  $C_8E_4$  et (4) en Triton X100.

### III.2.2 Etude de la porine ScVDAC1 en HDX-MS

#### III.2.2.1 Carte peptidique de la porine ScVDAC1 purifiée en C₈E₄ ou C₁₀E₆

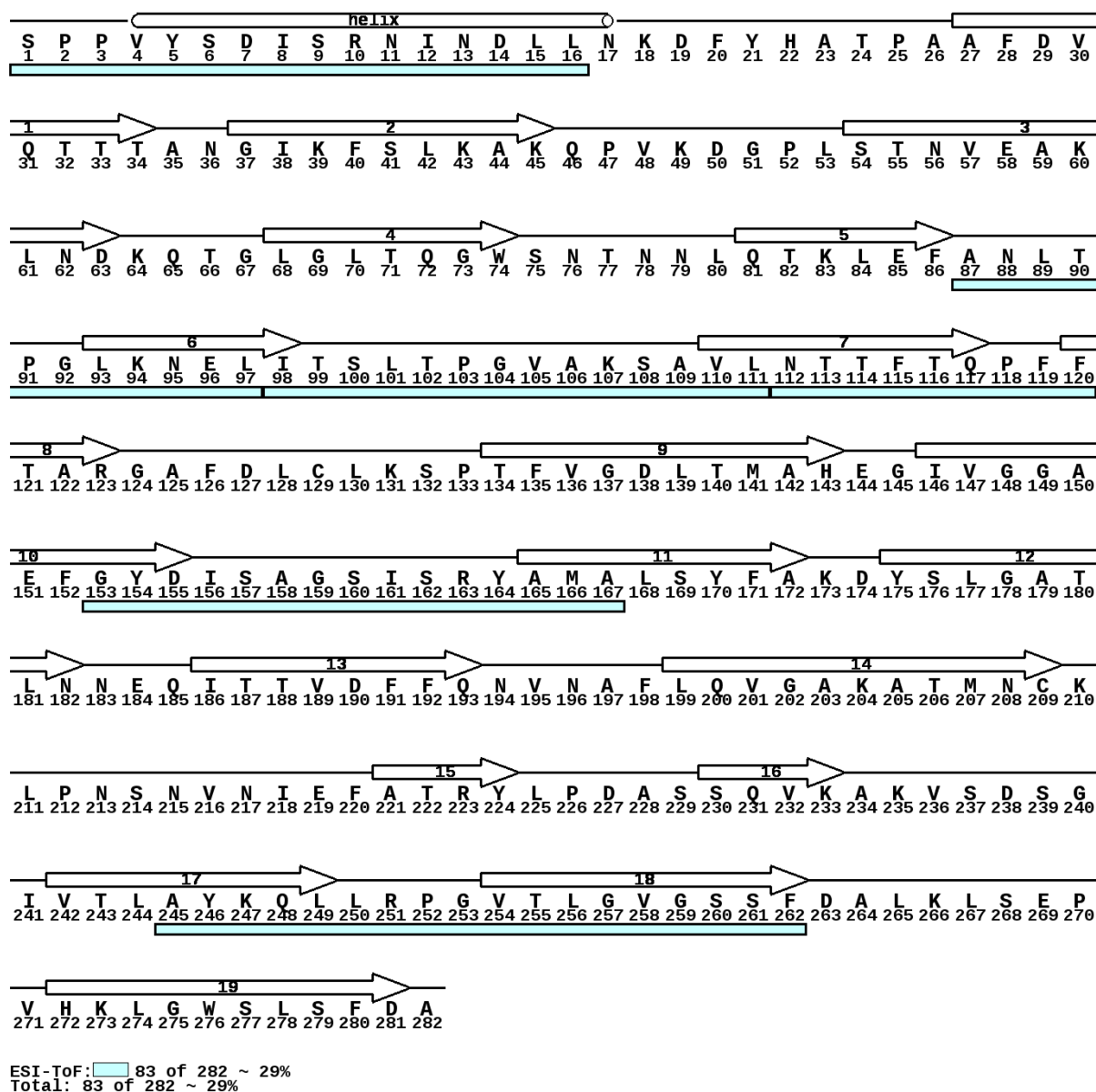
Nous avons pu remarquer au laboratoire que le VDAC de levure est préférentiellement purifiée par chromatographie sur une colonne d'HTP après solubilisation de l'extrait membranaire mitochondrial par un détergent à chaîne courte (~C7-C9). C'est le contraire pour les membres de la MCF (~C12-C14). Le détergent C₁₀E₆ présente une pureté chimique inférieure au détergent C₈E₄. Il est donc contaminé par des formes de la molécule qui ont des chaînes plus longues. Ainsi, du transporteur ScAnc2p en quantité non négligeable est observé lorsque la porine ScVDAC1 est purifiée à partir d'une souche de levure classiquement utilisée au laboratoire (*JLI-3ANC2*) par chromatographie sur une colonne d'HTP (**Figure III.2.7, pistes 1 et 2**). Ce problème a été rapidement résolu en utilisant une autre souche disponible au laboratoire dépourvue initialement d'Ancp (**Figure III.2.7, piste 3**).



**Figure III.2.7 : Purification du ScVDAC1 solubilisé en C₁₀E₆ par chromatographie sur une colonne d'HTP.** Les expériences ont été réalisées comme décrit dans la légende de la Figure III.2.3 (Vcol/Vlysate = 1 ; D/P = 1). Analyse par SDS-PAGE (gel à 15%) des éluats obtenus après centrifugation du lysat mitochondrial sur la colonne d'HTP puis coloration au bleu de Coomassie. Lysat mitochondrial préparé à partir de la souche de levure *JLI-3ANC2* avant (1) ou après passage (2) dans la colonne d'HTP ; (3) après purification à partir d'une souche de levure dépourvue initialement d'Ancp (*JLI-3*).

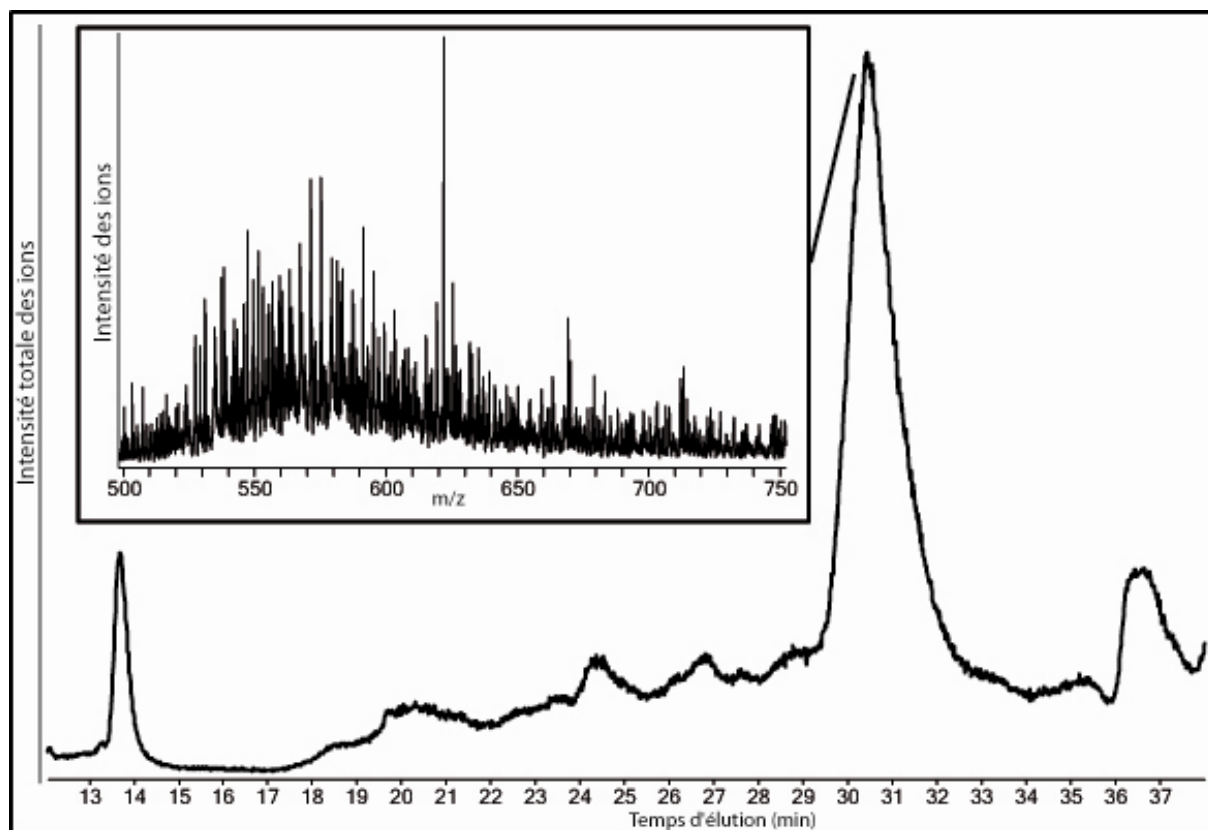
Comme précédemment pour l'analyse du PiC ou du ScAnc2p complexé à ses inhibiteurs, les expériences de HDX-MS menées sur ScVDAC1 ont été analysées par ESI-ToF-MS. Cette méthode permet uniquement d'obtenir des masses d'ions et ne suffit pas à elle seule pour identifier formellement les peptides contenus dans le mélange après action des protéases. L'identification des peptides provenant de SVDAC1 ne peut être réalisée que si les valeurs des masses observées en ESI-ToF-MS coïncident parfaitement avec la masse de fragments de ScVDAC1 théoriques et identifiés préalablement par ESI-MSMS dans les mêmes conditions expérimentales de digestion. Cette dernière technique permet en effet le séquençage de peptides par analyse des fragments générés par l'appareil, principalement au niveau de la liaison peptidique. L'identification de la séquence des peptides libérés après protéolyse de la porine par la pepsine immobilisée et leur localisation dans la séquence de ScVDAC1 a été effectuée en comparant les spectres de masse des fragments obtenus lors de l'analyse avec les spectres de fragmentation théorique générés par les logiciels GPMW ou MASCOT. L'utilisation de cette technique a permis l'identification des ions observés en ESI-ToF-MS et la réalisation d'une carte peptidique de ScVDAC1 contenant l'ensemble des peptides observables lors des expériences d'HDX-MS (**Figure III.2.8**).

Parmi tous les peptides identifiés (9 au total), seulement 6 présentaient une qualité suffisante pour être utilisés dans les expériences d'HDX-MS. Ils couvrent seulement 29% de la séquence peptidique de ScVDAC1. Ils sont principalement localisés dans l'extrémité *N*-terminale de la protéine et les feuillets présumés 6, 7, 17 et 18 du tonneau. Des résultats similaires ont été obtenus avec le détergent C₈E₄. Ce faible recouvrement s'explique probablement par une résistance à la protéolyse de certaines parties du tonneau, principalement les régions peptidiques 43-86, 121-152 et 168-244. L'ajout de chlorure de guanidinium au cours de l'étape de protéolyse n'a pas amélioré ce recouvrement. La qualité des signaux enregistrés en ToF s'est toujours avérée bien inférieure à celle des signaux obtenus dans le cadre de l'étude des membres de la MCF (**Figure III.2.9**). Nous avons suggéré que la présence en grande quantité d'ergostérol dans nos échantillons ainsi que la protéolyse partielle du VDAC puissent causer des problèmes de détection lors de l'analyse en MS.

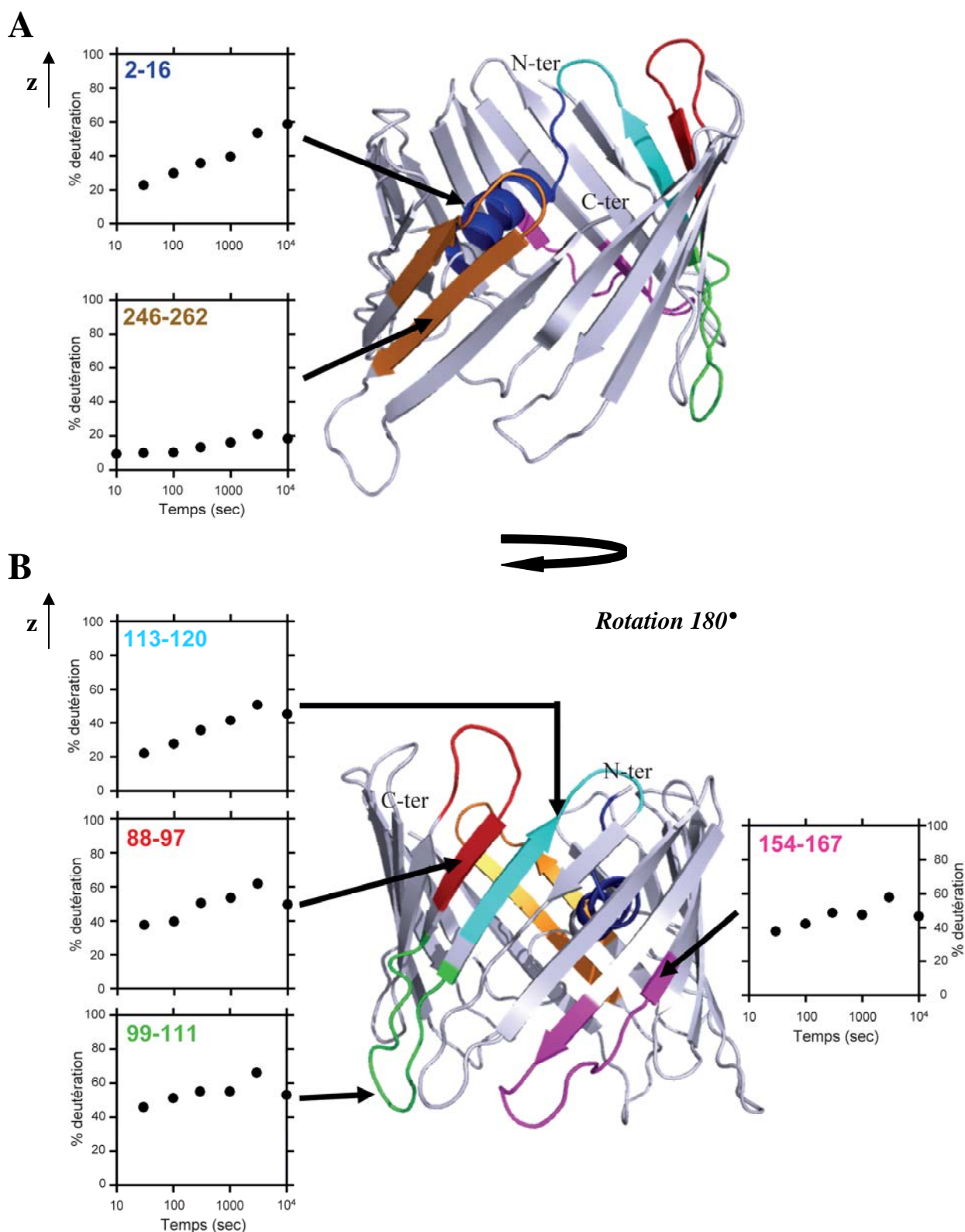


**Figure III.2.8 : Carte peptidique de la porine ScVDAC1 digérée par la pepsine immobilisée.** Les peptides identifiés en ESI-ToF-MS (29% de recouvrement) sont représentés, par des traits bleus disposés au dessous de la séquence peptidique de la porine ScVDAC1. Les feuillets présumés du tonneau (numéroté de 1 à 19) sont représentées par des flèches horizontales tandis que l'hélice *N*-terminale est représentée par un cylindre. Ces structures secondaires sont disposées au dessus de la séquence primaire. Leur localisation est déduite d'une modélisation de la porine ScVDAC1 à partir des données cristallographique de la porine humaine (2JK4) *via* le programme Pres3D.





**Figure III.2.9 : Profil d'élution HPLC des peptides (ionisés) obtenus à l'issue de la protéolyse et analyse des pics d'élution en ESI-ToF-MS.** L'élution des peptides piégés dans la microtrap est réalisée avec un gradient d'acétonitrile variant de 15 à 40% sur une durée de 25 minutes. La séparation des peptides générés dans la colonne de pepsine s'effectue sur une colonne en phase inverse de type C18. Encart : l'analyse en ESI-ToF-MS montre la présence dans le pic majoritaire du chromatogramme de nombreux peptides issus probablement d'une digestion partielle de la porine ScVDAC1. La superposition ces pics empêche la résolution des massifs isotopiques correspondant à chaque ion et rend par conséquent difficile l'analyse.



**Figure III.2.10 : Cinétique de deutération des régions peptidiques de la porine ScVDAC1 analysée en LC-ESI-ToF-MS.** La protéine de levure a été modélisée à l'aide du logiciel Pres3D. (A) Vue latérale de la structure 3D par rapport à la membrane ; (B) après rotation de 180° suivant un axe vertical z. La cinétique de deutération obtenue pour chacune des régions peptidiques analysables en HDX-MS (identifiées sur la structure présumée par des couleurs particulières) est représentée sous la forme de graphique (pourcentages de deutération par rapport au maximum théorique en fonction du temps exprimé en seconde).

### III.2.2.2 Analyse de l'accessibilité au solvant de la porine ScVDAC1 en HDX-MS

Bien que le nombre de peptides obtenus et analysables en HDX-MS ne soit pas à la hauteur de nos espérances, il n'en reste pas moins que certains d'entre eux sont localisés dans des zones intéressantes de la porine VDAC1. Il nous a été possible de modéliser la structure 3D du VDAC1 de levure à partir des données structurales cristallographiques de la porine humaine et donc de proposer une position dans l'espace des régions peptidiques analysables (**Figure III.2.10**).

La région peptidique 2-16 correspond à l'extrémité *N*-terminale de la porine (**Figure III.2.8**). Son organisation dans la protéine fait débat. En effet, une structure en hélice  $\alpha$  a été proposée d'après les structures 3D cristallographiques des porines VDAC1 humaine et murine. Au contraire, cette région n'est pas organisée dans la structure 3D du VDAC1 humain obtenue à l'aide des données de spectroscopie de RMN (pour revue : (Colombini, 2009)). Cependant, quel que soit le cas de figure, l'extrémité *N*-terminale du VDAC est localisée à l'intérieur du pore. L'analyse de cette région montre que sa deutération au cours du temps varie progressivement de 20 à 60% par rapport au maximum théorique au cours de l'expérience d'HDX (**Figure III.2.10**). Ce résultat suggère probablement une structuration de l'extrémité *N*-terminale de la porine ScVDAC1. En effet, il est possible de présumer que l'absence de structuration de cette région aurait plutôt eu comme conséquence une deutération beaucoup plus rapide dans le temps imparti à l'expérience d'HDX. Cette interprétation doit cependant être prise avec précaution. Les régions peptidiques 99-111 et 154-167 (côté espace intermembranaire) correspondraient à des boucles reliant respectivement les feuillets 6-7 et 10-11 (**Figure III.2.8**). Ces deux régions semblent être aisément accessibles au solvant puisqu'elles se deutèrent respectivement à 46 et 38% après 30s d'HDX. Le maximum de deutération (~55% et ~47% d'HDX, respectivement) est obtenu après seulement 300s (**Figure III.2.10**). Un comportement similaire est également observé avec la région peptidique 88-97 qui correspondrait à l'extrémité *N*-terminal du feuillet 6 et à la boucle cytosolique reliant les feuillets 5-6 (**Figure III.2.8**). En effet, sa deutération varie de 37 à 50% au cours de l'expérience (**Figure III.2.10**). En résumé, ces résultats sont en accord avec le positionnement présumé de ces régions face au solvant. Enfin, les régions peptidiques 113-120 et 246-262 devraient correspondre respectivement au feuillet 7 et au feuillet 17-18 (**Figure III.2.8**). La première région se deutère moins rapidement que les régions exposées au solvant, passant de 22% après 30s d'HDX à 45% à la fin de l'expérience probablement à cause de son organisation en feuillet. En effet, il est possible de proposer que la partie du feuillet exposé au détergent soit moins accessible au solvant que la partie du feuillet orienté à l'intérieur

du pore, Etrangement, la seconde région ne présente pas le même comportement. En effet, elle reste faiblement deutérée ( $\sim 20\%$  après 10000s d'HDX). Cette protection pourrait témoigner de la présence de l'extrémité *N*-terminale à proximité. En effet, cette observation corrèle les données cristallographiques qui montrent que cette dernière région du VDAC1 humain interagit avec le feuillet 18 du canal(Ujwal *et al.*, 2008).



## Partie IV

# Discussion générale

### Sommaire

---

<b>IV. 1 Etude conformationnelle et fonctionnelle du transporteur ScAnc2p .....</b>	<b>182</b>
<b>IV. 2 L’HDX-MS : une nouvelle méthode complémentaire d’analyse conformationnelle en biologie structurale étendue aux protéines membranaires .....</b>	<b>189</b>
IV.2.1 Etude des transporteurs mitochondriaux de <i>S. cerevisiae</i> .....	190
IV.2.2 Etude de la porine VDAC1 de <i>S. cerevisiae</i> .....	192
<b>Conclusions &amp; perspectives .....</b>	<b>193</b>

---

#### IV. 1 Etude conformationnelle et fonctionnelle du transporteur ScAnc2p

De part leurs fonctions biologiques primordiales pour la mitochondrie, les membres de la MCF font l'objet d'études depuis plusieurs dizaines d'années. Actuellement, on dénombre plus d'une trentaine de transporteurs mitochondriaux différents et ce chiffre ne cesse d'évoluer. En effet, il a été découvert en 2010, un nouveau membre nommé Yhm2p qui réalise l'échange d'oxoglutarate cytosolique contre du citrate matriciel (Castegna *et al.*, 2010). La plupart de ces transporteurs ont été isolés et caractérisés au niveau biochimique après reconstitution en liposomes (pour revue : (Palmieri *et al.*, 2006)). Cependant, malgré les efforts scientifiques déployés pour étudier cette famille de transporteurs, leur structure, leur spécificité et le mécanisme mis en jeu dans le transport de petits solutés sont loin d'être parfaitement connus au niveau moléculaire. Les membres de la MCF présentent des propriétés structurales communes. Il est donc fort probable que ces transporteurs partagent un mécanisme commun dans la translocation de substrats. Ainsi, leurs différences dicteraient leurs spécificités (Kunji et Robinson, 2006).

Parmi les transporteurs mitochondriaux, les Ancp sont les plus étudiés pour trois principales raisons. La première concerne la spécificité du substrats des Ancp qui réalisent l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP néosynthétisé dans la matrice mitochondriale. Ainsi, pour des organismes aérobies stricts, les Ancp jouent un rôle déterminant dans la survie. D'ailleurs, toute défaillance de ce transporteur entraîne chez l'homme des pathologies handicapantes telles que des ophtalmoplégies ou mortelles comme des cardiomyopathies (Trezeguet *et al.*, 2008). La seconde raison est associée à l'abondance naturelle de cette protéine dans la membrane interne mitochondriale. Enfin, son étude a été facilitée par l'identification de deux inhibiteurs naturels spécifiques : le CATR et le BA, de structures différentes, capables de figer le transporteur dans des états conformationnels extrêmes adoptés au cours du mécanisme de transport de l'ADP et de l'ATP. Les données de la littérature montrent sans équivoque que les complexes Ancp-CATR et Ancp-BA présentent des propriétés biochimiques, immunologiques et structurales différentes. Une meilleure compréhension du mécanisme de transport des nucléotides passe par une caractérisation complète de ces deux complexes.

Les transporteurs bovin Anc1p et de levure Anc2p sont les plus étudiés. Le premier de ces modèles a permis de résoudre au sein de notre laboratoire, en collaboration avec l'IBS de Grenoble, la première structure cristallographique à haute résolution d'un Ancp complexé au CATR (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Le second est principalement utilisé pour des études structure/fonction car les approches génétiques y sont facilitées. Une technique de

photomarquage utilisant des analogues non transportables de l'ADP, tels que le 2N₃-N-ADP, a permis d'identifier des parties de ScAnc2p capables de fixer l'ADP (Dianoux *et al.*, 2000). Les résultats obtenus ont montré l'existence de deux régions peptidiques. Il s'agit du peptide S182-R190 localisé, d'après la structure bovine, dans la boucle m2 constituant le fond de la cavité et du peptide M309-K317 correspondant à l'extrémité C-terminale. L'implication fonctionnelle de la boucle m2 de ScAnc2p dans le mécanisme moléculaire du transport des nucléotides a par la suite été investiguée (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). Son accessibilité à la trypsine et à des réactifs fluorescents de fonction thiol dépend de l'état conformationnel adopté par le transporteur en présence de CATR ou de BA. Un mouvement de la boucle m2 assurant le transport des nucléotides à l'intérieur de la cavité a été proposé (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). Le premier travail que j'ai mené au cours de ma thèse s'inscrit dans la suite de ce projet, c'est à dire la caractérisation fonctionnelle de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p à l'aide d'un éventail de technique biochimique, biophysiques et de biologie moléculaire.

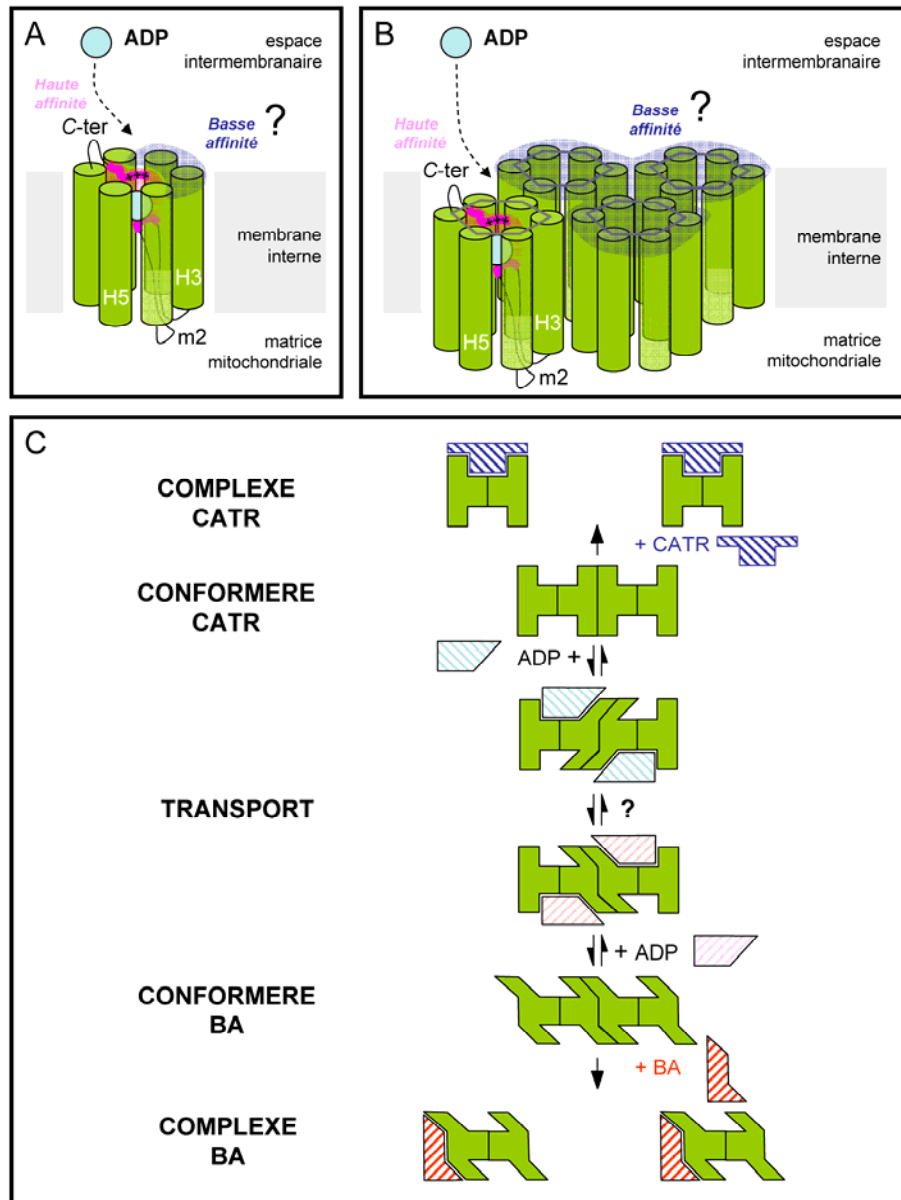
L'étude comparative des souches de levure exprimant la protéine sauvage ScAnc2p, ou cette même protéine dépourvue de son extrémité C-terminale, a permis de confirmer les résultats de photomarquage et montre l'importance de cette région protéique dans la fixation de l'ADP (**cf. article 1**). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence l'existence dans le transporteur sauvage de deux familles de sites de hautes et de faibles affinités du côté de l'espace intermembranaire. Des résultats similaires ont été obtenus avec le transporteur bovin Anc1p (Block et Vignais, 1984). Le transporteur de levure Anc2p dépourvu de son extrémité C-terminale présente une seule et unique famille de sites de fixation de l'ADP de faible affinité. Cependant, le nombre total de sites ADP ne varie pas entre le transporteur sauvage et celui muté. En parallèle, nous avons pu montrer par des approches immunologiques (suivi de l'accessibilité dans la membrane mitochondriale de l'extrémité C-terminale de ScAnc2p à un anticorps) et biophysique (fluorescence intrinsèque des tryptophanes) que l'extrémité C-terminale était probablement sujette à des mouvements conformationnels en présence de ligands.

En résumé, cette région de ScAnc2p n'est pas, à proprement parlé, un site de fixation d'un nucléotide mais participe à sa formation en permettant le passage d'une famille de sites de faible affinité à une autre de haute affinité *via* des changements conformationnels (**cf. article 1**). Ce résultat suggère également qu'une seule famille de site, probablement celle de haute affinité, a été photomarké par le 2N₃-N-ADP. L'ensemble de ces résultats soulève de nouvelles questions qui sont discutées ci-après.

Les Ancp sont caractérisés sur une même face membranaire par deux familles de sites de fixation de l'ADP, l'une de haute affinité et l'autre de faible affinité, (**cf. article 1**) (Block et



Vignais, 1984). Cette information peut être interprétée de deux façons différentes. Considérant une structure monomérique fonctionnelle de ScAnc2p suggérée dans de récents travaux (Bamber *et al.*, 2006; Bamber *et al.*, 2007a; Bamber *et al.*, 2007b), ces deux familles de sites seraient donc localisées sur un seul et unique monomère. Dans ce modèle, il est fort probable que la boucle remontante m2 photomarkée par le 2N₃-N-ADP corresponde à l'une de ces deux familles de sites. Nous proposons donc que l'extrémité C-terminale participe en présence de la boucle m2 à la formation d'une famille de sites de haute affinité située dans la partie supérieure de la cavité face à l'espace intermembranaire mitochondrial (**Figure IV.1A**). Cette hypothèse est renforcée par la présence d'un triplet de résidus lysine KKFK localisé à l'extrémité C-terminale de ScAnc2p qui est relativement bien conservé d'un organisme à un autre (KKFV chez bAnc1p). La protonation à pH physiologique des résidus lysine favoriserait alors l'entrée de polyanions que sont les molécules d'ADP dans la cavité. Concernant la seconde famille de sites, celle de faible affinité, sa localisation sur le monomère du côté intermembranaire est rendue difficile par le manque de données biochimiques disponibles à son sujet. Ce modèle de transport monomérique est cependant remis en cause. En effet, les Ancp assurent l'échange d'un nucléotide de la matrice vers l'espace intermembranaire et d'un autre dans le sens contraire. Ce mécanisme mettrait alors en jeu le passage simultané à travers la cavité de deux nucléotides. Cette hypothèse est difficilement envisageable à cause du diamètre de la cavité limité semble-t-il à la taille d'un nucléotide. Par contre, il est admis que les complexes bAnc1p-CATR et bAnc1p-BA présentent tous deux une stoechiométrie de 2 : 1 suggérant une structure minimale dimérique du transporteur (Block et Vignais, 1984). Comme le nombre total des sites ADP dans les mitochondries équivaut à celui des sites CATR ou BA, et qu'il existe deux familles de sites ADP, il a donc été proposé dans la littérature qu'une unité fonctionnelle de bAnc1p corresponde non pas à une structure dimérique mais plutôt tétramérique (Block et Vignais, 1984) (**voir Figure IV.1C**). Des résultats similaires ont été obtenus dans notre étude de ScAnc2p (**cf. article 1**). En conséquence, il est donc envisageable de considérer un autre modèle dans lequel ScAnc2p correspondrait à un multimère. Il serait alors possible de positionner la famille de sites de faibles affinités sur un autre monomère du multimère face à l'espace intermembranaire (**voir Figure IV.1B**). Cette dernière hypothèse fait néanmoins l'objet de controverse. En effet, la structure tridimensionnelle du complexe bAnc1p-CATR est un monomère (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Son analyse par ultracentrifugation analytique aboutit aux mêmes interprétations (Nury *et al.*, 2008).



**Figure IV.1 : Organisation hypothétique dans la membrane interne mitochondriale de l'unité de transport des nucléotides adényliques.** Modèles de fixation de l'ADP sur le transporteur de levure Anc2p dans un état monomérique (A) ou multimérique (B) proposés à partir des résultats obtenus dans ce travail de thèse combinés à ceux de la littérature. Sur la face intermembranaire de la membrane interne mitochondriale, nous proposons l'existence de deux familles de sites de fixation de l'ADP, l'une de haute affinité et l'autre de faible affinité. Dans ces modèles, il est proposé, qu'une région de la boucle matricielle remontante m2 associée à une partie de l'extrémité C-terminale puisse former la première de ces deux familles de sites (zone rosée). La localisation de la deuxième famille de sites (zone grisée) n'est pas définie. (C), modèle proposé pour le transporteur bovin Anc1p (Thèse de Marc Block 1984) qui fait intervenir une organisation tétramérique possédant 4 sites nucléotidiques potentiels, deux sites seulement étant occupé en même temps, l'un sur la face matriciel et l'autre sur la face intermembranaire, lorsqu'il s'agit de nucléotides transportés. En présence de nucléotides, l'organisation tétramérique conduirait à une coopérativité négative sur les sites situés d'un même côté de la membrane, et une coopérativité positive entre les sites externes et internes de l'unité de transport. Lors de la fixation des inhibiteurs spécifiques du transport (CATR et BA), le tétramère se scinde en deux dimères soit dans la membrane, soit pendant la solubilisation de l'Ancp par les détergents. Nos résultats biochimiques sur ScAnc2p sont en accord avec ce modèle.

Des résultats similaires ont été obtenus pour ScAnc2p *via* des approches biochimiques et biophysiques (Bamber *et al.*, 2006; Bamber *et al.*, 2007a; Bamber *et al.*, 2007b). En conclusion, le doute persiste sur l'état oligomérique des Ancp et donc sur l'interprétation des données biochimiques. Par contre, l'ensemble de ces données montre sans équivoque l'implication de mouvements moléculaires permettant le passage des nucléotides au travers de la cavité. Ce phénomène a été montré localement pour ScAnc2p aussi bien dans l'étude de son extrémité C-terminale (**cf. article 1**) que dans celle de sa boucle matricielle m2 (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). Cette approche reste néanmoins limitée à la zone étudiée (quelques acides aminés). Afin d'analyser à une plus grande échelle la dynamique conformationnelle de ScAnc2p, nous avons donc décidé de développer une tout autre approche utilisant l'HDX-MS. La mise au point de cette technique appliquée aux protéines membranaires a été réalisée dans notre laboratoire en collaboration avec l'IBS de Grenoble (Rey *et al.*, 2010b). L'analyse du transporteur bovin Anc1p a été la première étape dans la validation de ce projet. En effet, les résultats obtenus montrent que l'accessibilité au solvant du complexe bAnc1p-CATR corrèle parfaitement avec sa structure tridimensionnelle (Rey *et al.*, 2010a). L'étude comparative des complexes bAnc1p-BA et bAnc1p-CATR qui a suivi, suggère le passage, respectivement, d'une conformation ouverte vers l'espace matriciel et fermée du côté espace intermembranaire à une autre fermée du côté matriciel et ouverte à l'espace intermembranaire (Rey *et al.*, 2010a). Une telle dynamique conformationnelle a également été mise en évidence pour ScAnc2p (**cf. Article 2**). Ces résultats illustrent clairement la plasticité des Ancp qui a pour but d'assurer leur fonction de transport. Cependant, des différences conformationnelles persistent entre les transporteurs de levure Anc2p et bovin Anc1p. En effet, contrairement au complexe bAnc1p-BA, nous avons pu montrer que le complexe ScAnc2p-BA restait très accessible au solvant (notamment à l'intérieur de sa cavité) du côté intermembranaire (**cf. Article 2**). Ces interprétations confirment les données obtenues par Dahout-Gonzalez *et al.*, qui montrent une accessibilité *in organello* de la boucle matricielle m2 de ScAnc2p du côté de l'espace intermembranaire par une protéase en présence de CATR ou de BA. Par contre, le transporteur bovin Anc1p complexé au CATR est remarquablement résistant à la protéolyse dans les mêmes conditions (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005). En conséquence, bien que les transporteurs ScAnc2p et bAnc1p partagent approximativement 50% d'identité de séquence, l'ensemble de ces résultats suggère un mécanisme moléculaire du transport significativement différent d'un modèle à un autre. Il est important de préciser que l'analyse en HDX-MS des transporteurs bAnc1p et ScAnc2p complexés aux inhibiteurs CATR et BA a été basée sur l'existence en solution, après purification par chromatographie sur une colonne d'HTP, de structure monomérique des complexes Ancp-inhibiteur. En effet, *via* la méthode d'analyse en

HDX-MS, nous n'avons eu aucune évidence expérimentale de l'existence de structures multimériques en solution de détergent constitués de monomères différents au niveau de leur accessibilité au solvant qui reflète leur état conformationnel. Cependant, il n'est pas impossible que l'utilisation de concentrations élevées en détergent lors du processus d'extraction à partir des membranes puisse dissocier les multimères de transporteurs en monomères. Ainsi, les monomères stabilisés par la fixation du CATR ou du BA ne seraient pas retenus sur la colonne d'HTP contrairement à ceux n'ayant pas fixé d'inhibiteur. Après l'étape de purification, il est intéressant de noter que le lavage de la colonne d'HTP par une solution de phosphate de sodium (PiNa) 0,5M permet d'éluer une quantité non négligeable d'Ancp au préalablement retenu (résultat non montré). Ces protéines pourraient donc correspondre aux autres monomères n'ayant pas fixés l'inhibiteur.

L'étude en HDX-MS de la dynamique conformationnelle du transporteur de levure Anc2p a permis de montrer que son extrémité C-terminale était sujette à des variations d'accessibilité au solvant en fonction de l'inhibiteur testé. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment et confortent l'hypothèse de mouvements moléculaires liés à cette région de ScAnc2p. Le principe même de l'analyse en HDX-MS réside dans l'utilisation de protéases acides afin d'obtenir des peptides de petites tailles (entre 2 et 10 résidus d'acides aminés). Ainsi, il est donc possible de localiser avec précision les deutériums incorporés dans la protéine. L'étude en HDX-MS de ScAnc2p a permis de mettre en évidence de fines régions du transporteur qui présentaient des différences importantes d'accessibilité au solvant d'un conformère à un autre. Ces résultats suggèrent un rôle fonctionnel de ces parties. L'une d'entre elles correspond au motif RRRMMM commun à tous les Ancp, quelle que soit leur origine végétale, fongique ou animale. La première partie de ce motif a été étudiée précédemment, il s'agit du triplet de résidus arginines. Il a été montré que ces résidus sont indispensables à l'activité de transport (Nelson *et al.*, 1993). Ils sont impliqués dans la fixation du CATR et participent aux ponts salins qui ferment la cavité du côté matricielle (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Dans le cadre de ma thèse, je me suis donc intéressé à la seconde partie de ce motif, à savoir le triplet de résidus méthionines. La première étape de mon travail a été la création d'une banque de mutants de ScAnc2p dans lequel les résidus méthionine ont été remplacés par des résidus alanine. Toutes les combinaisons possibles ont été envisagées avec un triple mutant, trois doubles mutants et trois simples mutants. L'import dans la mitochondrie des protéines mutantes a été vérifié (**cf. article 2**). Les résultats obtenus ont montré que la présence des résidus M254 et M256 était indispensable au développement des levures sur un milieu non fermentescible et à la fixation des atractylosides et donc probablement à celle des nucléotides. La mutation du résidu

M255 affecte négativement la liaison du transporteur à son substrat. Ainsi, *via* une approche de mutagenèse dirigée, j'ai donc pu montrer qu'une différence d'accessibilité au solvant d'une région précise de ScAnc2p pouvait être directement associée à une fonction dans le mécanisme du transport des nucléotides adényliques et plus particulièrement dans leur fixation. Par contre, l'inverse n'est pas réciproque. Ainsi, les régions peptidiques couvrant l'hélice H4 de ScAnc2p présentent une accessibilité au solvant qui varie peu en fonction de l'inhibiteur utilisé. Des résultats similaires ont été obtenus avec bAnc1p *via* la même approche (Rey *et al.*, 2010a). Or l'échelle de résidus aromatiques présente sur cette même hélice participe à la translocation des nucléotides à travers la cavité du transporteur ScAnc2p (David *et al.*, 2008).

Nous proposons que la présence du triplet MMM puisse également participer à la spécificité des Ancp. En effet, plusieurs membres de la MCF ont récemment été caractérisés (Palmieri *et al.*, 2008; Fiermonte *et al.*, 2009). Ces transporteurs ont une fonction commune d'assurer le transport de nucléotides adényliques ainsi que leurs dérivés. Il s'agit par exemple du transporteur ADNT1 qui permet l'échange d'ATP, de dATP et à une moindre mesure d'ADP, de dADP et plus étonnant d'AMP (je tiens à rappeler que l'AMP n'est pas transporté par les Ancp). Dans ADNT1, le motif RRRMMM est remplacé par le motif RRRMQM. Autre exemple avec le transporteur SLC25A42 qui présente une affinité plus importante pour le coenzyme A, l'adénosine 3'-5'-diphosphate que pour l'AMP, l'ADP et l'ATP (Fiermonte *et al.*, 2009). Dans SLC25A42, seul le motif RRRM est conservé. En conclusion, une dégénérescence du triplet MMM observée dans ces transporteurs s'accompagne donc d'une diminution de leur spécificité à fixer et à transporter l'ADP et l'ATP. Enfin, nous avons pu identifier des mutations intragéniques « second site » pour la mutation M254A. Il est intéressant de noter que ces dernières touchent, pour la plupart, des acides aminés conservés dans les Ancp et qui se localisent étrangement dans la partie haute de la cavité face à l'espace intermembranaire. Hors, la mutation M254A affecte le fond de la cavité. Ce phénomène n'est pas unidirectionnel. En effet, de récents travaux réalisés dans notre équipe sur l'étude, dans *S. cerevisiae*, des mutations pathogènes du transporteur humain Anc1p montrent que la mutation A90D (équivalent au résidu A105 chez *S. cerevisiae*) localisée dans le haut de la cavité côté espace intermembranaire est extrêmement néfaste pour la croissance des levures sur un milieu non fermentescible. Cependant, elle peut être compensée par une mutation intragénique « second site » localisé dans le motif RRRMMM qui est remplacé par RRRKMM (résultats non publiés). L'ensemble de ces observations illustre ainsi une réelle synergie entre le haut de la cavité qui est face à l'espace intermembranaire et le fond orienté du côté matriciel. Ce phénomène confirme parfaitement l'hypothèse d'une cavité malléable dans

laquelle des changements conformationnels importants apparaissent lors du transport de l'ADP et de l'ATP, confirmant la dynamique conformationnel mis en évidence par l'HDX-MS.

Enfin, l'étude des mutants du triplet MMM a montré le rôle clef de ces résidus méthionine dans la fixation des atractylosides, ce qui est loin d'être évident lorsque l'on regarde la structure 3D du complexe bAnc1p-CATR. Parmi les mutants « second site » obtenus pour la mutation M254A, deux d'entre eux (G29C et G297S) ont déjà été caractérisés dans la littérature (Zeman *et al.*, 2003). En effet, les souches de levure exprimant les transporteurs ScAnc2p^{G29C} (G29S similaire à G29C) et ScAnc2p^{G297S} présente un phénotype de résistance au BA par rapport au transporteur sauvage. On peut signaler que les souches de levure exprimant les transporteurs mutés « second site » ScAnc2p^{AMM,G29S} et ScAnc2p^{AMM,G297S} présentent elles aussi le même phénotype. A la vue de ces résultats, il est donc tentant de proposer que le mutant ScAnc2p^{AMM} soit bloqué dans un état conformationnel proche de celui du complexe ScAnc2p-BA.

En conclusion, nous avons pu illustrer, à l'aide de différentes approches complémentaires (biochimiques, biophysiques, *etc.*), la dynamique conformationnelle du transporteur ScAnc2p. Les résultats obtenus montrent la complexité du mécanisme de transport des nucléotides à travers la cavité. L'application de la technique d'HDX-MS aux Ancp et en particulier à ScAnc2p (où la génétique est facilitée) a donné une dimension nouvelle à l'étude des relations structure/fonction. Son adaptation à l'étude des Ancp, et de façon plus générale à celle des protéines membranaires, s'est donc révélée déterminante dans la réussite de ce projet.

## **IV.2 L'HDXMS : une nouvelle méthode complémentaire d'analyse conformationnelle en biologie structurale étendue aux protéines membranaires**

Actuellement, trois techniques différentes sont disponibles pour étudier la structure des protéines. Il s'agit de la cristallographie aux rayons X, de la spectroscopie de RMN et de la diffraction électronique. Même si ces approches structurales sont reconnues extrêmement performantes, notamment la cristallographie aux rayons X qui a permis de résoudre une grande majorité des 40000 structures déposées dans la PDB, elle présente néanmoins comme toute méthode des limites. En effet, la cristallographie fournit la position précise des atomes sans limite de taille (ex : ribosome). En revanche, les atomes d'hydrogènes sont difficiles à observer. Des problèmes de phases s'ajoutent et la technique impose le passage de la protéine sous la forme d'un cristal. La spectroscopie de RMN est moins précise que la cristallographie et peut difficilement étudier des molécules dont la taille est supérieure à 50 kDa. En revanche, elle a

l'énorme avantage de fournir des informations sur la dynamique de la macromolécule étudiée en solution. Enfin, la diffraction électronique fournit une structure globale sans limite de taille. En revanche elle crée des dommages sur l'échantillon et donne une structure à basse résolution. Sur la base de ces constatations, on comprend bien qu'aucune de ces méthodes n'est parfaite. Elles s'efforcent cependant de documenter et de décrire des fonctions et des mécanismes biologiques de plus en plus complexes pour lesquelles interviennent souvent de nombreux partenaires macromoléculaires. En biologie structurale, il est couramment admis que la structure 3D d'une protéine détermine sa fonction. Ce paradigme est vrai si et seulement si cette 3D correspond avec exactitude à celle *in vivo*. Il est donc nécessaire de le montrer *via* d'autres approches, principalement biochimiques et biophysiques. Cette remarque prend tout son sens dans l'étude des protéines membranaires mitochondriales telles que l'Ancp et le VDAC. En effet, dans les deux cas, la structure de ces protéines est sujette à controverse par rapport à certaines données biochimiques et biophysiques (pour revue : (Trezeguet *et al.*, 2008; Colombini, 2009). Il s'avère donc nécessaire de développer de nouvelles approches applicables aux protéines membranaires complémentaires des méthodes physico-chimiques classiquement utilisées au regard du nombre croissant de protéines identifiées pour lesquelles l'obtention d'une structure est désirée.

C'est dans cet objectif que la SM a montré tout son potentiel. Associée à l'HDX, elle permet l'obtention de données structurales intéressantes à l'échelle moléculaire et représente donc un outil d'analyse innovant et performant. Appliqué jusqu'à maintenant aux protéines solubles, son champ d'action s'est vu élargi en 2010 (Rey *et al.*, 2010a; Rey *et al.*, 2010b) à une classe de protéines dont les données structurales accusent un retard considérable : les protéines membranaires.

#### IV.2.1 Etude des transporteurs mitochondriaux de *S. Cerevisiae*

Depuis ces 40 dernières années, quel que soit le modèle utilisé (bovin ou fongique), l'objectif du laboratoire a été d'élucider le mécanisme moléculaire du transport de l'ADP et de l'ATP à travers les membranes mitochondriales *via* l'étude des Ancp. Ce mécanisme reste à ce jour une véritable énigme. Afin de donner des éléments de réponse à ce problème, des approches différentes et en général innovatrices dans le domaine ont pu être abordées. Il s'agit par exemple i), d'explorer les états conformationnels des Ancp par fluorescence intrinsèque des tryptophanes (Brandolin *et al.*, 1981) ou extrinsèque (grâce à l'utilisation de sondes spécifiques) (Brandolin *et al.*, 1982; Boulay *et al.*, 1983); ii), d'identifier leur topographie dans la membrane avec l'utilisation d'anticorps dirigés contre différentes régions de la protéine (Brandolin *et al.*, 1989),

à l'aide de marquages par des réactifs chimiques (Boulay et Vignais, 1984; Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005) ou par protéolyse ménagée (Brandolin *et al.*, 1989; Dahout-Gonzalez *et al.*, 2005) ; iii), de caractériser des sites de fixation des nucléotides à l'aide d'agents photoactivables (Dalbon *et al.*, 1988; Dianoux *et al.*, 2000). Ainsi, les Ancp se sont révélés être des modèles de choix dans l'application de ces techniques qui étaient pionnières à l'époque. Un exemple plus récent concerne l'obtention de la structure à haute résolution du transporteur bAnc1p complexé à l'inhibiteur CATR par cristallographie aux rayons X. Cet Ancp fait donc partie des rares protéines membranaires dont la structure tridimensionnelle est connue. A ce titre, le développement de la technique d'HDX-MS en vue d'étudier l'accessibilité des protéines membranaires en solution et dans leur environnement lipidique, et en particulier celle des Ancp, s'inscrit dans cette logique. Les résultats obtenus ont été discutés dans le § IV.1 et dans la référence (Rey *et al.*, 2010a) appliquée aux protéines membranaires.

La mise au point de cette technique concerne principalement le développement de nouveaux outils de protéolyse (Rey *et al.*, 2009) et d'élimination du détergent dans les produits de digestions peptidiques. Les résultats obtenus montrent que les transporteurs ScAnc2p et bAnc1p ne sont pas sensibles à toutes les protéases acides disponibles. La plus efficace est la pepsine. Cependant, il a été possible d'observer des différences entre les deux transporteurs. En effet, la moitié *N*-terminale de bAnc1p semble être digérée plus efficacement que la moitié *C*-terminale (Rey *et al.*, 2010b). Par contre, la digestion ménagée de ScAnc2p est assez homogène le long de la séquence (**voir article 1**). L'étude de la dynamique conformationnelle de ScAnc2p en HDX-MS a été l'occasion d'analyser également l'accessibilité d'un autre membre de la MCF, le transporteur de phosphate (PiC). Contrairement aux Ancp, les PiC sont peu étudiés. Cette protéine copurifiée avec ScAnc2p (Brandolin *et al.*, 1993), bien qu'il soit minoritaire dans nos préparations, nous avons pu obtenir les premières données de deutération concernant ce transporteur. Un recouvrement de 36% a été obtenu en HDX-MS. Les zones concernées correspondraient principalement aux hélices transmembranaires H2, H4 et H5 et aux boucles matricielles m1, m2 et m3. Cependant, des difficultés ont été rencontrées dans l'analyse car, contrairement aux Ancp, le PiC n'était pas inhibé et donc pas stabilisé en solution de détergent. Ce problème a été en partie résolu en réalisant les cinétiques de deutération non pas à 20°C mais à 0°C ou en inhibant au préalable le PiC dans les membranes en présence de NEM. A l'inverse des Ancp, les régions du PiC analysables en HDX-MS présentent un profil de deutération assez similaires sans réelle distinction de structure secondaire. En effet, étrangement, les régions couvertes correspondant aux domaines transmembranaires présentent à 0°C entre 50 et 70% de deutération en fin d'expérience par rapport au maximum théorique. Ce résultat laisse



supposer que la cavité du PiC dans nos conditions expérimentales est très accessible au solvant. Cependant, nous avons pu constater que les variations de deutération mesurées à 0° et à 20°C étaient faibles ce qui est en désaccord avec les principes même de l'HDX. En conclusion, bien qu'ils soient reproductibles, nos résultats et donc nos interprétations doivent être pris avec précaution.

#### IV.2.2 Etude de la porine VDAC1 de *S. cerevisiae*

Notre attention s'est également portée sur l'étude en solution de détergent de la porine VDAC1 donc plusieurs structures ont été déterminées en 2008 (Bayrhuber *et al.*, 2008; Hiller *et al.*, 2008; Ujwal *et al.*, 2008). Cette protéine organisée en tonneau  $\beta$  présente également un domaine *N*-terminal dont l'organisation et la position diffère d'une structure à une autre (pour revue : (Summers et Court, 2010)). Le principal objectif de ce projet a été de mettre à profit nos connaissances de l'HDX-MS appliquées aux membres de la MCF, à l'étude d'une autre classe de protéines membranaires mitochondriales de structure différente, les porines. La mise au point des différentes étapes pour analyser l'accessibilité au solvant du VDAC1 de *S. cerevisiae* (purification, digestion, élimination du détergent puis analyse en SM) s'est révélée fastidieuse contrairement aux Ancp. Le principal problème rencontré réside dans la résistance de ScVDAC1 aux protéases acides. En effet, ScVDAC1 est insensible aux protéases acides de type XIII et XVIII (recombinante ou commerciale). Elle est dégradée partiellement par la pepsine. Enfin, la présence ou l'absence de chlorure de guanidinium n'améliore pas la qualité des produits de protéolyse qui réside dans l'obtention de peptides courts et si possible se chevauchant. Ces constatations mettent en évidence l'étape clef mais néanmoins limitante de l'analyse en HDX-MS.

Cependant, malgré les difficultés rencontrées, il a été possible d'analyser 6 peptides couvrant à eux seuls approximativement 30% de la séquence primaire du ScVDAC1. Ils sont localisés pour 5 d'entre-deux dans le tonneau  $\beta$  et le dernier correspond à l'extrémité *N*-terminale. Les profils de deutération obtenus semblent être en accord avec les structures proposés. Cependant, le manque de régions peptidiques couvertes et la faible résolution d'analyse (aucun peptide ne se chevauchant) limitent fortement nos interprétations et le devenir de cette étude en absence de nouveaux outils de protéolyse.

# Conclusions & perspectives

Une partie de mon projet de recherche a eu pour principal objectif de donner des éléments de réponse concernant la compréhension au niveau moléculaire du mécanisme du transport de l'ADP et de l'ATP assuré par les Ancp mitochondriaux. Différentes approches ont été mises en œuvre. Les outils biochimiques (inhibiteurs, anticorps, sondes fluorescence, *etc.*) et génétiques (souches de levure) développés au laboratoire m'ont permis de caractériser au niveau fonctionnel deux régions précises de la principale isoforme étudiée de *S. cerevisiae* : Anc2p. La première, l'extrémité C-terminale, semble jouer un rôle prépondérant dans la fixation des nucléotides adényliques. La seconde, le triplet RRR, interviendrait également dans cette fonction et participerait à la sélectivité des substrats transportés. Devant les difficultés rencontrées pour obtenir la structure 3D à haute résolution du complexe Ancp-BA, nous avons donc décidé de développer une approche alternative, l'HDX-MS appliqué aux protéines membranaires, afin d'obtenir de nouvelles informations structurales sur ce complexe à l'échelle de la protéine ou de quelques acides aminés *via* l'analyse de son accessibilité au solvant. Les résultats obtenus dépassent nos espérances et confirment notamment les données biochimiques actuellement disponibles dans la littérature.

Les complexes Ancp-BA et Ancp-CATR représentent des états extrêmes adoptés au cours du transport de l'ADP et de l'ATP. L'élucidation de ce mécanisme étape par étape passe par l'isolement de nouveaux intermédiaires conformationnels. Dans cet objectif, le modèle levure s'est avéré être un outil idéal. Les résultats que j'ai obtenus ont permis probablement d'isoler en absence d'inhibiteur certains de ces conformères de la protéine. Il s'agit par exemple du mutant ScAnc2p^{AMM} qui semble être bloqué dans un état conformationnel proche de celui du conformère BA. L'analyse de ce mutant par l'HDX-MS sera réalisée afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. L'étude de la dynamique conformationnelle de ScAnc2p a mis en évidence d'autres régions intéressantes du transporteur dont l'étude biochimique sera réalisée à l'image du triplet RRR ou de l'extrémité C-terminale.

Enfin, nous avons pu obtenir les premières données d'accessibilité au solvant du transporteur PiC et de la porine ScVDAC1 en solution de détergent. Dans le cas du PiC, les résultats préliminaires sont très encourageants car cette protéine est minoritaire dans nos préparations. Son étude sera poursuivie et comparée à celle de ScAnc2p. En ce qui concerne la porine ScVDAC1, l'étape limitante est celle de la protéolyse. En effet, la structure en tonneau  $\beta$

de ces protéines semble particulièrement résistante aux protéases acides. Plusieurs alternatives sont actuellement explorées. La première réside dans l'utilisation de nouvelles protéases acides telles que la plasmepsine 2 (Marcoux et *al*, 2010) ou la protéase du HIV. La seconde alternative plus onéreuse est basée sur l'utilisation de la technique « *Presser cycling Technology* » qui permet d'assurer l'étape de digestion des protéines d'intérêt sous hautes pressions. L'objectif final est obtenir d'avantages de peptides, si possible se chevauchant, afin d'améliorer le recouvrement peptidique de la protéine. Une fois les problèmes de protéolyse résolus, l'étude en HDX-MS de l'extrémité *N*-terminale de ScVDAC1 pourrait être approfondit. L'analyse comparative de la porine sauvage ou de cette même protéine dépourvue de sa région *N*-terminale pourrait alors permettre de confirmer des zones d'interactions avec les feuillets du tonneau  $\beta$  et voir même d'en identifier de nouvelles *in vitro*. Une étude de l'accessibilité au solvant du VDAC1 est également envisagée *in organello* (deutération *in situ* des mitochondries). Cette dernière technique a fait ses preuves sur l'étude des Ancp (travaux en cours de publication) et reste à être adaptée à l'étude du VDAC1.

Partie V

Bibliographie

- Abrecht, H., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M. et Homble, F.** (2000). Structure and orientation of two voltage-dependent anion-selective channel isoforms. An attenuated total reflection fourier-transform infrared spectroscopy study. *J Biol Chem* **275**, 40992-9.
- Abu-Hamad, S., Zaid, H., Israelson, A., Nahon, E. et Shoshan-Barmatz, V.** (2008). Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. *J Biol Chem* **283**, 13482-90.
- Abu-Hamad, S., Arbel, N., Calo, D., Arzoine, L., Israelson, A., Keinan, N., Ben-Romano, R., Friedman, O. et Shoshan-Barmatz, V.** (2009). The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci* **122**, 1906-16.
- Agar, H. D. et Douglas, H. C.** (1957). Studies on the cytological structure of yeast: electron microscopy of thin sections. *J Bacteriol* **73**, 365-75.
- Al Jamal, J. A.** (2005). Involvement of porin N,N-dicyclohexylcarbodiimide-reactive domain in hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane. *Protein J* **24**, 1-8.
- Albrecht, R., Rehling, P., Chacinska, A., Brix, J., Cadamuro, S. A., Volkmer, R., Guiard, B., Pfanner, N. et Zeth, K.** (2006). The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes. *EMBO Rep* **7**, 1233-8.
- Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. et Klingenberg, M.** (1978). Isolation of the ADP/ATP translocator from beef heart mitochondria as the bongkrekate-protein complex. *Eur J Biochem* **85**, 549-60.
- Aquila, H., Link, T. A. et Klingenberg, M.** (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *Embo J* **4**, 2369-76.
- Aquila, H., Link, T. A. et Klingenberg, M.** (1987). Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett* **212**, 1-9.
- Ardail, D., Gasnier, F., Lerme, F., Simonot, C., Louisot, P. et Gateau-Roesch, O.** (1993). Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* **268**, 25985-92.
- Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S. et Shoshan-Barmatz, V.** (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* **377**, 347-55.
- Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. et Englander, S. W.** (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86.
- Bakker, H. D., Scholte, H. R., Van den Bogert, C., Ruitenbeek, W., Jeneson, J. A., Wanders, R. J., Abeling, N. G., Dorland, B., Sengers, R. C. et Van Gennip, A. H.** (1993). Deficiency of the adenine nucleotide translocator in muscle of a patient with myopathy and lactic acidosis: a new mitochondrial defect. *Pediatr Res* **33**, 412-7.
- Bamber, L., Harding, M., Butler, P. J. et Kunji, E. R.** (2006). Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16224-9.
- Bamber, L., Harding, M., Monne, M., Slotboom, D. J. et Kunji, E. R.** (2007a). The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10830-4.

- Bamber, L., Slotboom, D. J. et Kunji, E. R.** (2007b). Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents as demonstrated by differential affinity purification. *J Mol Biol* **371**, 388-95.
- Barnidge, D. R., Dratz, E. A., Jesaitis, A. J. et Sunner, J.** (1999). Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **269**, 1-9.
- Barrera, N. P., Isaacson, S. C., Zhou, M., Bavro, V. N., Welch, A., Schaedler, T. A., Seeger, M. A., Miguel, R. N., Korkhov, V. M., van Veen, H. W., Venter, H., Walmsley, A. R., Tate, C. G. et Robinson, C. V.** (2009). Mass spectrometry of membrane transporters reveals subunit stoichiometry and interactions. *Nat Methods* **6**, 585-7.
- Bathori, G., Parolini, I., Szabo, I., Tombola, F., Messina, A., Oliva, M., Sargiacomo, M., De Pinto, V. et Zoratti, M.** (2000). Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 79-89.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M. et Zeth, K.** (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15370-5.
- Bereiter-Hahn, J.** (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* **122**, 1-63.
- Bessman, S. P. et Carpenter, C. L.** (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* **54**, 831-62.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B. et Brdiczka, D.** (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* **1368**, 7-18.
- Bisaccia, F., Zara, V., Capobianco, L., Iacobazzi, V., Mazzeo, M. et Palmieri, F.** (1996). The formation of a disulfide cross-link between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier. *Biochim Biophys Acta* **1292**, 281-88.
- Blachly-Dyson, E., Peng, S., Colombini, M. et Forte, M.** (1990). Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications. *Science* **247**, 1233-6.
- Blachly-Dyson, E., Baldini, A., Litt, M., McCabe, E. R. et Forte, M.** (1994). Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics* **20**, 62-7.
- Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W. J., Colombini, M. et Forte, M.** (1997). Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol* **17**, 5727-38.
- Block, M. R., Lauquin, G. J. et Vignais, P. V.** (1981). Chemical modifications of atractyloside and bongkrekic acid binding sites of the mitochondrial adenine nucleotide carrier. Are there distinct binding sites? *Biochemistry* **20**, 2692-9.
- Block, M. R., Zaccai, G., Lauquin, G. J. et Vignais, P. V.** (1982). Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent. *Biochem Biophys Res Commun* **109**, 471-7.

- Block, M. R. et Vignais, P. V.** (1984). Substrate-site interactions in the membrane-bound adenine-nucleotide carrier as disclosed by ADP and ATP analogs. *Biochim Biophys Acta* **767**, 369-76.
- Block, M. R., Boulay, F., Brandolin, G., Dupont, Y., Lauquin, G. J. et Vignais, P. V.** (1986). Fluorescent probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Methods Enzymol* **125**, 639-49.
- Blonder, J., Goshe, M. B., Moore, R. J., Pasa-Tolic, L., Masselon, C. D., Lipton, M. S. et Smith, R. D.** (2002). Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **1**, 351-60.
- Boldogh, I. R., Yang, H. C. et Pon, L. A.** (2001). Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic* **2**, 368-74.
- Boulay, F., Brandolin, G., Lauquin, G. J. et Vignais, P. V.** (1983). Synthesis and properties of fluorescent derivatives of atractyloside as potential probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Anal Biochem* **128**, 323-30.
- Boulay, F. et Vignais, P. V.** (1984). Localization of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Biochemistry* **23**, 4807-12.
- Brandolin, G., Meyer, C., Defaye, G., Vignais, P. M. et Vignais, P. V.** (1974). Partial purification of an atractyloside-binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* **46**, 149-53.
- Brandolin, G., Dupont, Y. et Vignais, P. V.** (1981). Substrate-induced fluorescence changes of the isolated ADP/ATP carrier protein in solution. *Biochem Biophys Res Commun* **98**, 28-35.
- Brandolin, G., Dupont, Y. et Vignais, P. V.** (1982). Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria. 2. Probing of the nucleotide sites by formycin triphosphate, a fluorescent transportable analogue of ATP. *Biochemistry* **21**, 6348-53.
- Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P. et Vignais, P. V.** (1989). Orientation of the N-terminal region of the membrane-bound ADP/ATP carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. Evidence that the accessibility of the N-terminal residues depends on the conformational state of the carrier. *Biochemistry* **28**, 1093-100.
- Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. et Vignais, P. V.** (1993a). Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 459-72.
- Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Vignais, P. V. et Lauquin, G. J.** (1993b). Biochemical characterisation of the isolated Anc2 adenine nucleotide carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 143-50.
- Brdiczka, D.** (1991). Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* **1071**, 291-312.
- Brdiczka, D., Kaldis, P. et Wallimann, T.** (1994). In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. *J Biol Chem* **269**, 27640-4.
- Brdiczka, D. G., Zorov, D. B. et Sheu, S. S.** (2006). Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 148-63.

- Brinkworth, C. S. et Bourne, D. J.** (2007). The effect of Tween80 on signal intensity of intact proteins by MALDI time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**, 102-5.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. et Pfanner, N.** (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* **274**, 16522-30.
- Burke, J. E., Karbarz, M. J., Deems, R. A., Li, S., Woods, V. L., Jr. et Dennis, E. A.** (2008). Interaction of group IA phospholipase A2 with metal ions and phospholipid vesicles probed with deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry* **47**, 6451-9.
- Casadio, R., Jacoboni, I., Messina, A. et De Pinto, V.** (2002). A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* **520**, 1-7.
- Castegna, A., Scarcia, P., Agrimi, G., Palmieri, L., Rottensteiner, H., Spera, I., Germinario, L. et Palmieri, F.** (2010). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**, 17359-70.
- Cesar Mde, C. et Wilson, J. E.** (2004). All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. *Arch Biochem Biophys* **422**, 191-6.
- Chen, E. I., McClatchy, D., Park, S. K. et Yates, J. R., 3rd** (2008). Comparisons of mass spectrometry compatible surfactants for global analysis of the mammalian brain proteome. *Anal Chem* **80**, 8694-701.
- Choudhary, O. P., Ujwal, R., Kowallis, W., Coalson, R., Abramson, J. et Grabe, M.** (2010). The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating. *J Mol Biol* **396**, 580-92.
- Chowdhury, S. K., Katta, V. et Chait, B. T.** (1990). Electrospray ionization mass spectrometric peptide mapping: a rapid, sensitive technique for protein structure analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **167**, 686-92.
- Cl  men  on, B., Rey, M., Dianoux, A. C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Brandolin, G. et Pelosi, L.** (2008). Structure-function relationships of the C-terminal end of the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2. *J Biol Chem* **283**, 11218-25.
- Colombini, M.** (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* **279**, 643-5.
- Colombini, M.** (1980). Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Ann N Y Acad Sci* **341**, 552-63.
- Colombini, M.** (1989). Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* **111**, 103-11.
- Colombini, M.** (2004). VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 107-15.
- Colombini, M.** (2009). The published 3D structure of the VDAC channel: native or not? *Trends Biochem Sci* **34**, 382-9.
- Coonrod, E. M., Karren, M. A. et Shaw, J. M.** (2007). Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic* **8**, 500-11.



- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R. A., Jansonius, J. N. et Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* **358**, 727-33.
- Cravello, L., Lascoux, D. et Forest, E. (2003). Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 2387-93.
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. et Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J* **21**, 942-53.
- Dahout-Gonzalez, C., Ramus, C., Dassa, E. P., Dianoux, A. C. et Brandolin, G. (2005). Conformation-dependent swinging of the matrix loop m2 of the mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier. *Biochemistry* **44**, 16310-20.
- Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Pebay-Peyroula, E. et Brandolin, G. (2006). Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda)* **21**, 242-9.
- Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J. et Vignais, P. V. (1988). Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[alpha-32P]adenosine diphosphate. *Biochemistry* **27**, 5141-9.
- Dassa, E. P., Dahout-Gonzalez, C., Dianoux, A. C. et Brandolin, G. (2005). Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome c fusion protein. *Protein Expr Purif* **40**, 358-69.
- Daum, G., Gasser, S. M. et Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 13075-80.
- David, C., Arnou, B., Sanchez, J. F., Pelosi, L., Brandolin, G., Lauquin, G. J. et Trezeguet, V. (2008). Two residues of a conserved aromatic ladder of the mitochondrial ADP/ATP carrier are crucial to nucleotide transport. *Biochemistry* **47**, 13223-31.
- De Marcos Lousa, C., Trezeguet, V., Dianoux, A. C., Brandolin, G. et Lauquin, G. J. (2002). The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* **41**, 14412-20.
- De Pinto, V., Ludwig, O., Krause, J., Benz, R. et Palmieri, F. (1987). Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. *Biochim Biophys Acta* **894**, 109-19.
- De Pinto, V., Benz, R. et Palmieri, F. (1989). Interaction of non-classical detergents with the mitochondrial porin. A new purification procedure and characterization of the pore-forming unit. *Eur J Biochem* **183**, 179-87.
- De Pinto, V., Zara, V., Benz, R., Gnoni, G. V. et Palmieri, F. (1991). Characterization of pore-forming activity in liver mitochondria from *Anguilla anguilla*. Two porins in mitochondria? *Biochim Biophys Acta* **1061**, 279-86.
- De Pinto, V., Reina, S., Guarino, F. et Messina, A. (2008). Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 139-47.

- Demmers, J. A., Rijkers, D. T., Haverkamp, J., Killian, J. A. et Heck, A. J.** (2002). Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination. *J Am Chem Soc* **124**, 11191-8.
- Deschauer, M., Hudson, G., Muller, T., Taylor, R. W., Chinnery, P. F. et Zierz, S.** (2005). A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* **15**, 311-5.
- Detmer, S. A. et Chan, D. C.** (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 870-9.
- Dianoux, A. C., Noel, F., Fiore, C., Trezeguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2000). Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[beta-32P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry* **39**, 11477-87.
- Diezel, W., Kopperschlager, G. et Hofmann, E.** (1972). An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* **48**, 617-20.
- Dihanich, M., Suda, K. et Schatz, G.** (1987). A yeast mutant lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kd extramitochondrial protein. *Embo J* **6**, 723-8.
- Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W. et Wallimann, T.** (1999). Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J Struct Biol* **127**, 64-71.
- Drgon, T., Sabova, L., Nelson, N. et Kolarov, J.** (1991). ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **289**, 159-62.
- Duee, E. D. et Vignais, P. V.** (1965). [Exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides]. *Biochim Biophys Acta* **107**, 184-8.
- Dupont, Y., Brandolin, G. et Vignais, P. V.** (1982). Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria. 1. Probing of the nucleotide sites by Naphthoyl-ATP, a fluorescent nontransportable analogue of ATP. *Biochemistry* **21**, 6343-7.
- Duszynski, J., Bogucka, K., Letko, G., Kuster, U., Kunz, W. et Wojtczak, L.** (1981). Relationship between the energy cost of ATP transport and ATP synthesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **637**, 217-23.
- Dyson, H. J. et Wright, P. E.** (2004). Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607-22.
- Egner, A., Jakobs, S. et Hell, S. W.** (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3370-5.
- Engstova, H., Zackova, M., Ruzicka, M., Meinhardt, A., Hanus, J., Kramer, R. et Jezek, P.** (2001). Natural and azido fatty acids inhibit phosphate transport and activate fatty acid anion uniport mediated by the mitochondrial phosphate carrier. *J Biol Chem* **276**, 4683-91.
- Ernster, L. et Schatz, G.** (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* **91**, 227s-255s.

- Fiermonte, G., Paradies, E., Todisco, S., Marobbio, C. M. et Palmieri, F.** (2009). A novel member of solute carrier family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme A and adenosine 3',5'-diphosphate in human mitochondria. *J Biol Chem* **284**, 18152-9.
- Fiore, C., Trezeguet, V., Roux, P., Le Saux, A., Noel, F., Schwimmer, C., Arlot, D., Dianoux, A. C., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2000). Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region. *Protein Expr Purif* **19**, 57-65.
- Fiore, C., Arlot-Guilligay, D., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2001). Fluorometric detection of ADP/ATP carrier deficiency in human muscle. *Clin Chim Acta* **311**, 125-35.
- Florke, H., Thinnies, F. P., Winkelbach, H., Stadtmüller, U., Paetzold, G., Morys-Wortmann, C., Hesse, D., Sternbach, H., Zimmermann, B., Kaufmann-Kolle, P. et al.** (1994). Channel active mammalian porin, purified from crude membrane fractions of human B lymphocytes and bovine skeletal muscle, reversibly binds adenosine triphosphate (ATP). *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**, 513-20.
- Forte, M., Guy, H. R. et Mannella, C. A.** (1987). Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J Bioenerg Biomembr* **19**, 341-50.
- Fraser, F. et Zammit, V. A.** (1998). Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria. *Biochem J* **329** ( Pt 2), 225-9.
- Freitag, H. et Kadenbach, B.** (1978). Transport of phosphate analogues in rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* **83**, 53-7.
- Freitag, H., Genchi, G., Benz, R., Palmieri, F. et Neupert, W.** (1982a). Isolation of mitochondrial porin from *Neurospora crassa*. *FEBS Lett* **145**, 72-6.
- Freitag, H., Neupert, W. et Benz, R.** (1982b). Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **123**, 629-36.
- Frey, T. G. et Mannella, C. A.** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 319-24.
- Froschauer, E. M., Schweyen, R. J. et Wiesenberger, G.** (2009). The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 1044-50.
- Garcia, R. A., Pantazatos, D. et Villarreal, F. J.** (2004). Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for investigating protein-ligand interactions. *Assay Drug Dev Technol* **2**, 81-91.
- Gavurnikova, G., Sabova, L., Kissova, I., Haviernik, P. et Kolarov, J.** (1996). Transcription of the AAC1 gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur J Biochem* **239**, 759-63.
- Goncalves, R. P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J. N. et Scheuring, S.** (2007). Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes. *J Mol Biol* **369**, 413-8.
- Graham, B. H., Waymire, K. G., Cottrell, B., Trounce, I. A., MacGregor, G. R. et Wallace, D. C.** (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* **16**, 226-34.

- Guo, X. W. et Mannella, C. A.** (1993). Conformational change in the mitochondrial channel, VDAC, detected by electron cryo-microscopy. *Biophys J* **64**, 545-9.
- Guo, X. W., Smith, P. R., Cognon, B., D'Arcangelis, D., Dolginova, E. et Mannella, C. A.** (1995). Molecular design of the voltage-dependent, anion-selective channel in the mitochondrial outer membrane. *J Struct Biol* **114**, 41-59.
- Hackenberg, H. et Klingenberg, M.** (1980). Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate--adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* **19**, 548-55.
- Hackenbrock, C. R.** (1968). Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 598-605.
- Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T. et Fredriksson, R.** (2006). Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* **88**, 779-90.
- Halestrap, A. P. et Brenner, C.** (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* **10**, 1507-25.
- Haris, P. I. et Chapman, D.** (1992). Does Fourier-transform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures? *Trends Biochem Sci* **17**, 328-33.
- Hashimoto, M., Shinohara, Y., Majima, E., Hatanaka, T., Yamazaki, N. et Terada, H.** (1999). Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers. *Biochim Biophys Acta* **1409**, 113-24.
- Hatanaka, T., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2001a). Significant effect of the N-terminal region of the mitochondrial ADP/ATP carrier on its efficient expression in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 28881-8.
- Hatanaka, T., Kihira, Y., Shinohara, Y., Majima, E. et Terada, H.** (2001b). Characterization of loops of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier facing the cytosol by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 936-42.
- Hatanaka, T., Takemoto, Y., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2001c). Significant expression of functional human type 1 mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria. *Biol Pharm Bull* **24**, 595-9.
- Heggeness, M. H., Simon, M. et Singer, S. J.** (1978). Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3863-6.
- Henderson, P. J. et Lardy, H. A.** (1970). Bongkreikic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. *J Biol Chem* **245**, 1319-26.
- Herick, K., Stappen, R. et Krämer, R.** (1995). Comparaison of functional and structural aspects of the reconstituted phosphate and aspartate/glutamate carrier from mitochondria. *Thirty Years of Progress in Mitochondrial Bioenergetics and Molecular Biology* (Palmieri, F., ed) pp.83-87, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Herskowitz, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536-53.

- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M. et Wagner, G. (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* **321**, 1206-10.
- Hilser, V. J. et Freire, E. (1996). Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. Correlation with hydrogen exchange protection factors. *J Mol Biol* **262**, 756-72.
- Hinsch, K. D., De Pinto, V., Aires, V. A., Schneider, X., Messina, A. et Hinsch, E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Biol Chem* **279**, 15281-8.
- Hoerner, J. K., Xiao, H., Dobo, A. et Kaltashov, I. A. (2004). Is there hydrogen scrambling in the gas phase? Energetic and structural determinants of proton mobility within protein ions. *J Am Chem Soc* **126**, 7709-17.
- Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A. et Fotiadis, D. (2007). The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol* **370**, 246-55.
- Hoppel, C., Kerner, J., Turkaly, P., Minkler, P. et Tandler, B. (2002). Isolation of hepatic mitochondrial contact sites: previously unrecognized inner membrane components. *Anal Biochem* **302**, 60-9.
- Hsu, Y. H., Burke, J. E., Li, S., Woods, V. L., Jr. et Dennis, E. A. (2009). Localizing the membrane binding region of Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂ using peptide amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem* **284**, 23652-61.
- Iwahashi, A., Kihira, Y., Majima, E., Terada, H., Yamazaki, N., Kataoka, M. et Shinohara, Y. (2006). The structure of the second cytosolic loop of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier AAC2 is dependent on the conformational state. *Mitochondrion* **6**, 245-51.
- Iwahashi, A., Ishii, A., Yamazaki, N., Hashimoto, M., Ohkura, K., Kataoka, M., Majima, E., Terada, H. et Shinohara, Y. (2008). Functionally important conserved length of C-terminal regions of yeast and bovine ADP/ATP carriers, identified by deletion mutants studies, and water accessibility of the amino acids at the C-terminal region of the yeast carrier. *Mitochondrion* **8**, 196-204.
- Israelson, A., Abu-Hamad, S., Zaid, H., Nahon, E., Shoshan-Barmatz, V. (2007). Localization of the voltage-dependent anion channel-1 Ca²⁺-binding sites. *Cell Calcium*, **41**, 235-44.
- Jacobus, W. E. et Lehninger, A. L. (1973). Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem* **248**, 4803-10.
- Jeanteur, D., Lakey, J. H. et Pattus, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol* **5**, 2153-64.
- Joh, N. H., Min, A., Faham, S., Whitelegge, J. P., Yang, D., Woods, V. L. et Bowie, J. U. (2008). Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature* **453**, 1266-70.
- Jorgensen, T. J., Gardsvoll, H., Ploug, M. et Roepstorff, P. (2005). Intramolecular migration of amide hydrogens in protonated peptides upon collisional activation. *J Am Chem Soc* **127**, 2785-93.

- Katta, V. et Chait, B. T.** (1991). Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **5**, 214-7.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kytälä, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L. et Suomalainen, A.** (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* **289**, 782-5.
- Kihira, Y., Iwahashi, A., Majima, E., Terada, H. et Shinohara, Y.** (2004). Twisting of the second transmembrane alpha-helix of the mitochondrial ADP/ATP carrier during the transition between two carrier conformational states. *Biochemistry* **43**, 15204-9.
- Kihira, Y., Majima, E., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2005). Cysteine labeling studies detect conformational changes in region 106-132 of the mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **44**, 184-92.
- Klingenberg, M. et Pfaff, E.** (1968). Metabolic control in mitochondria by adenine nucleotide translocation. *Biochem Soc Symp* **27**, 105-22.
- Klingenberg, M.** (1980). The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* **56**, 97-105.
- Klingenberg, M., Winkler, E. et Echtay, K.** (2001). Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation. *Biochem Soc Trans* **29**, 806-11.
- Klingenberg, M.** (2008). The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1978-2021.
- Kolarov, J., Kolarova, N. et Nelson, N.** (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem* **265**, 12711-6.
- Komaki, H., Fukazawa, T., Houzen, H., Yoshida, K., Nonaka, I. et Goto, Y.** (2002). A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions. *Ann Neurol* **51**, 645-8.
- Koppel, D. A., Kinnally, K. W., Masters, P., Forte, M., Blachly-Dyson, E. et Mannella, C. A.** (1998). Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer membrane channel. Effects of n-terminal modifications. *J Biol Chem* **273**, 13794-800.
- Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E. et Kaplan, R. S.** (1999). Oligomeric state of wild-type and cysteine-less yeast mitochondrial citrate transport proteins. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 543-9.
- Kramer, R. et Klingenberg, M.** (1980). Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry* **19**, 556-60.
- Kramer, R.** (1982). Cholesterol as activator of ADP-ATP exchange in reconstituted liposomes and in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **693**, 296-304.
- Kramer, R. et Palmieri, F.** (1989). Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **974**, 1-23.
- Kuan, J. et Saier, M. H., Jr.** (1993). The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**, 209-33.

- Kunji, E. R. et Robinson, A. J.** (2006). The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1237-48.
- Lacapere, J. J., Pebay-Peyroula, E., Neumann, J. M. et Etchebest, C.** (2007). Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem Sci* **32**, 259-70.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LaNoue, K., Mizani, S. M. et Klingenberg, M.** (1978). Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **253**, 191-8.
- Lauquin, G., Lunardi, J. et Vignais, P. V.** (1976a). Effect of genetic and physiological manipulations on the kinetic and binding parameters of the adenine nucleotide translocator in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Biochimie* **58**, 1213-20.
- Lauquin, G. J., Duplaa, A. M., Klein, G., Rousseau, A. et Vignais, P. V.** (1976b). Isobongkreic acid, a new inhibitor of mitochondrial ADP-ATP transport: radioactive labeling and chemical and biological properties. *Biochemistry* **15**, 2323-7.
- Lawson, J. E. et Douglas, M. G.** (1988). Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* **263**, 14812-8.
- le Coutre, J., Whitelegge, J. P., Gross, A., Turk, E., Wright, E. M., Kaback, H. R. et Faull, K. F.** (2000). Proteomics on full-length membrane proteins using mass spectrometry. *Biochemistry* **39**, 4237-42.
- Le Saux, A., Roux, P., Trezeguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Vignais, P. V., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.** (1996). Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. 1. Tryptophanyl residues of the carrier can be mutated without impairing protein activity. *Biochemistry* **35**, 16116-24.
- Lee, A. C., Zizi, M. et Colombini, M.** (1994). Beta-NADH decreases the permeability of the mitochondrial outer membrane to ADP by a factor of 6. *J Biol Chem* **269**, 30974-80.
- Lee, A. C., Xu, X., Blachly-Dyson, E., Forte, M. et Colombini, M.** (1998). The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol* **161**, 173-81.
- Lemeshko, S. V. et Lemeshko, V. V.** (2000). Metabolically derived potential on the outer membrane of mitochondria: a computational model. *Biophys J* **79**, 2785-800.
- Lemeshko, S. V. et Lemeshko, V. V.** (2004). Energy flux modulation on the outer membrane of mitochondria by metabolically-derived potential. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 127-39.
- Linden, M. et Gellerfors, P.** (1983). Hydrodynamic properties of porin isolated from outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **736**, 125-9.
- Liu, M. Y. et Colombini, M.** (1992). Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim Biophys Acta* **1098**, 255-60.
- Ludwig, O., Krause, J., Hay, R. et Benz, R.** (1988). Purification and characterization of the pore forming protein of yeast mitochondrial outer membrane. *Eur Biophys J* **15**, 269-76.

- Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P. et Pronk, J. T.** (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**, 24529-34.
- MacLeod, J. K., Lewis, I. A., Moeller, P. D. et Oelrichs, P. B.** (1990). The toxic extractives from *Wedelia asperima*, III. Structures of two naturally occurring rhamnosyl analogues of wedeloside. *J Nat Prod* **53**, 1256-61.
- Majima, E., Koike, H., Hong, Y. M., Shinohara, Y. et Terada, H.** (1993). Characterization of cysteine residues of mitochondrial ADP/ATP carrier with the SH-reagents eosin 5-maleimide and N-ethylmaleimide. *J Biol Chem* **268**, 22181-7.
- Majima, E., Takeda, M., Miki, S., Shinohara, Y. et Terada, H.** (2002). Close location of the first loop to the third loop of the mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from cross-linking catalyzed by copper-o-phenanthroline of the solubilized carrier with Triton X-100. *J Biochem* **131**, 461-8.
- Malia, T. J. et Wagner, G.** (2007). NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* **46**, 514-25.
- Man, P., Montagner, C., Vernier, G., Dublet, B., Chenal, A., Forest, E. et Forge, V.** (2007). Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *J Mol Biol* **368**, 464-72.
- Mannella, C. A. et Bonner, W. D., Jr.** (1975). Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **413**, 213-25.
- Mannella, C. A.** (1982). Structure of the outer mitochondrial membrane: ordered arrays of porelike subunits in outer-membrane fractions from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Cell Biol* **94**, 680-7.
- Mannella, C. A.** (1998). Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J Struct Biol* **121**, 207-18.
- Marcoux, J., Thierry, E., Vives, C., Signor, L., Fieschi, F. et Forest, E.** (2010). Investigating alternative acidic proteases for H/D exchange coupled to mass spectrometry: plasmepsin 2 but not plasmepsin 4 is active under quenching conditions. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 76-9.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C. et Kroemer, G.** (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* **187**, 1261-71.
- Mayer, I., Dahms, A. S., Riezler, W. et Klingenberg, M.** (1984). Interaction of fluorescent adenine nucleotide derivatives with the ADP/ATP carrier in mitochondria. 1. Comparison of various 3'-O-ester adenine nucleotide derivatives. *Biochemistry* **23**, 2436-42.
- Mayinger, P., Winkler, E. et Klingenberg, M.** (1989). The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett* **244**, 421-6.
- McDonald, B. M., Wydro, M. M., Lightowlers, R. N. et Lakey, J. H.** (2009). Probing the orientation of yeast VDAC1 in vivo. *FEBS Lett* **583**, 739-42.



- Meglei, G. et McQuibban, G. A.** (2009). The dynamin-related protein Mgm1p assembles into oligomers and hydrolyzes GTP to function in mitochondrial membrane fusion. *Biochemistry* **48**, 1774-84.
- Michejda, J., Guo, X. J. et Lauquin, G. J.** (1990). The respiration of cells and mitochondria of porin deficient yeast mutants is coupled. *Biochem Biophys Res Commun* **171**, 354-61.
- Mokranjac, D. et Neupert, W.** (2009). Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 33-41.
- Morris, R. L. et Hollenbeck, P. J.** (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* **131**, 1315-26.
- Muller, V., Basset, G., Nelson, D. R. et Klingenberg, M.** (1996). Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations of oxidative phosphorylation and AAC expression. *Biochemistry* **35**, 16132-43.
- Muller, V., Heidkamper, D., Nelson, D. R. et Klingenberg, M.** (1997). Mutagenesis of some positive and negative residues occurring in repeat triad residues in the ADP/ATP carrier from yeast. *Biochemistry* **36**, 16008-18.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Nakashima, R. A., Mangan, P. S., Colombini, M. et Pedersen, P. L.** (1986). Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry* **25**, 1015-21.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. et Hirokawa, N.** (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* **79**, 1209-20.
- Napoli, L., Bordoni, A., Zeviani, M., Hadjigeorgiou, G. M., Sciacco, M., Tiranti, V., Terentiu, A., Moggio, M., Papadimitriou, A., Scarlato, G. et Comi, G. P.** (2001). A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family. *Neurology* **57**, 2295-8.
- Nelson, D. R., Lawson, J. E., Klingenberg, M. et Douglas, M. G.** (1993). Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator. Six arginines and one lysine are essential. *J Mol Biol* **230**, 1159-70.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W. et Walter, P.** (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* **8**, 1233-42.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2005). Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett* **579**, 6031-6.
- Nury, H., Manon, F., Arnou, B., le Maire, M., Pebay-Peyroula, E. et Ebel, C.** (2008). Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species. *Biochemistry* **47**, 12319-31.

- Okamoto, K. et Shaw, J. M.** (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* **39**, 503-36.
- Palmieri, F., Agrimi, G., Blanco, E., Castegna, A., Di Noia, M. A., Iacobazzi, V., Lasorsa, F. M., Marobbio, C. M., Palmieri, L., Scarcia, P., Todisco, S., Voza, A. et Walker, J.** (2006). Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1249-62.
- Palmieri, L., Santoro, A., Carrari, F., Blanco, E., Nunes-Nesi, A., Arrigoni, R., Genchi, F., Fernie, A. R. et Palmieri, F.** (2008). Identification and characterization of ADNT1, a novel mitochondrial adenine nucleotide transporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**, 1797-808.
- Pan, J., Han, J., Borchers, C. H. et Konermann, L.** (2008). Electron capture dissociation of electrosprayed protein ions for spatially resolved hydrogen exchange measurements. *J Am Chem Soc* **130**, 11574-5.
- Pan, J., Han, J., Borchers, C. H. et Konermann, L.** (2009). Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein. *J Am Chem Soc* **131**, 12801-8.
- Papadopoulos, V. et Brown, A. S.** (1995). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 103-10.
- Pastorino, J. G. et Hoek, J. B.** (2003). Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* **10**, 1535-51.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractylolide. *Nature* **426**, 39-44.
- Peng, S., Blachly-Dyson, E., Forte, M. et Colombini, M.** (1992). Large scale rearrangement of protein domains is associated with voltage gating of the VDAC channel. *Biophys J* **62**, 123-31; discussion 131-5.
- Pfaff, E., Klingenberg, M. et Heldt, H. W.** (1965). Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **104**, 312-5.
- Phelps, A., Schobert, C. T. et Wohlrab, H.** (1991). Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **30**, 248-52.
- Phelps, A., Briggs, C., Mincone, L. et Wohlrab, H.** (1996). Mitochondrial phosphate transport protein. replacements of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton transport path. *Biochemistry* **35**, 10757-62.
- Popp, B., Schmid, A. et Benz, R.** (1995). Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organisms. *Biochemistry* **34**, 3352-61.
- Popp, B., Court, D. A., Benz, R., Neupert, W. et Lill, R.** (1996). The role of the N and C termini of recombinant *Neurospora* mitochondrial porin in channel formation and voltage-dependent gating. *J Biol Chem* **271**, 13593-9.
- Rauch, G. et Moran, O.** (1994). On the structure of mitochondrial porins and its homologies with bacterial porins. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 908-15.

- Reichert, A. S. et Neupert, W.** (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 41-9.
- Resing, K. A. et Ahn, N. G.** (1999). Applications of mass spectrometry to signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 501-23.
- Rey, M., Brazzolotto, X., Clemencon, B., Afchain, A., Brandolin, G. et Pelosi, L.** (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome c fusion protein: one-step purification and functional analysis in vitro. *Biochimie* **89**, 1070-9.
- Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E. et Pelosi, L.** (2009). Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 3431-8.
- Rey, M., Man, P., Clemencon, B., Trezeguet, V., Brandolin, G., Forest, E. et Pelosi, L.** (2010a). Conformational dynamics of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier isoform 1 revealed by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *J Biol Chem*.
- Rey, M., Mrazek, H., Pompach, P., Novak, P., Pelosi, L., Brandolin, G., Forest, E., Havlicek, V. et Man, P.** (2010b). Effective removal of nonionic detergents in protein mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, and proteomics. *Anal Chem* **82**, 5107-16.
- Riccio, P., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1975). Purification of the carboxy-tractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett* **56**, 133-8.
- Rosenfeld, E. et Beauvoit, B.** (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**, 1115-44.
- Rostovtseva, T. et Colombini, M.** (1997). VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* **72**, 1954-62.
- Rostovtseva, T. K. et Bezrukov, S. M.** (1998). ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J* **74**, 2365-73.
- Rostovtseva, T. K., Komarov, A., Bezrukov, S. M. et Colombini, M.** (2002a). VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J Membr Biol* **187**, 147-56.
- Rostovtseva, T. K., Komarov, A., Bezrukov, S. M. et Colombini, M.** (2002b). Dynamics of nucleotides in VDAC channels: structure-specific noise generation. *Biophys J* **82**, 193-205.
- Rostovtseva, T. K. et Bezrukov, S. M.** (2008). VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 163-70.
- Runke, G., Maier, E., Summers, W. A., Bay, D. C., Benz, R. et Court, D. A.** (2006). Deletion variants of *Neurospora* mitochondrial porin: electrophysiological and spectroscopic analysis. *Biophys J* **90**, 3155-64.
- Sabova, L., Zeman, I., Supek, F. et Kolarov, J.** (1993). Transcriptional control of AAC3 gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur J Biochem* **213**, 547-53.
- Sampson, M. J., Decker, W. K., Beaudet, A. L., Ruitenbeek, W., Armstrong, D., Hicks, M. J. et Craigen, W. J.** (2001). Immobile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem* **276**, 39206-12.

- Sarria, A. J., Lieber, J. G., Nordeen, S. K. et Evans, R. M.** (1994). The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J Cell Sci* **107** ( Pt 6), 1593-607.
- Schein, S. J., Colombini, M. et Finkelstein, A.** (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* **30**, 99-120.
- Schlattner, U., Forstner, M., Eder, M., Stachowiak, O., Fritz-Wolf, K. et Wallimann, T.** (1998). Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem* **184**, 125-40.
- Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T. et Tokarska-Schlattner, M.** (2001). Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* **276**, 48027-30.
- Schlattner, U., Gehring, F., Vernoux, N., Tokarska-Schlattner, M., Neumann, D., Marcillat, O., Vial, C. et Wallimann, T.** (2004). C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem* **279**, 24334-42.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Ramirez, S., Bruckner, A., Kay, L., Polge, C., Epand, R. F., Lee, R. M., Lacombe, M. L. et Epand, R. M.** (2009). Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 2032-47.
- Schroers, A., Kramer, R. et Wohlrab, H.** (1997). The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine. *J Biol Chem* **272**, 10558-64.
- Schroers, A., Burkovski, A., Wohlrab, H. et Kramer, R.** (1998). The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem* **273**, 14269-76.
- Shao, L., Kinnally, K. W. et Mannella, C. A.** (1996). Circular dichroism studies of the mitochondrial channel, VDAC, from *Neurospora crassa*. *Biophys J* **71**, 778-86.
- Shi, Y., Jiang, C., Chen, Q. et Tang, H.** (2003). One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 475-82.
- Shoshan-Barmatz, V. et Gincel, D.** (2003). The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* **39**, 279-92.
- Shoshan-Barmatz, V., Zalk, R., Gincel, D. et Vardi, N.** (2004). Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochim Biophys Acta* **1657**, 105-14.
- Siciliano, G., Tessa, A., Petrini, S., Mancuso, M., Bruno, C., Grieco, G. S., Malandrini, A., DeFlorio, L., Martini, B., Federico, A., Nappi, G., Santorelli, F. M. et Murri, L.** (2003). Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscul Disord* **13**, 162-5.
- Sikorski, R. S. et Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. et Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Song, J. et Colombini, M.** (1996). Indications of a common folding pattern for VDAC channels from all sources. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 153-61.
- Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M. et Colombini, M.** (1998). The topology of VDAC as probed by biotin modification. *J Biol Chem* **273**, 24406-13.
- Speer, O., Back, N., Buerklen, T., Brdiczka, D., Koretsky, A., Wallimann, T. et Eriksson, O.** (2005). Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J* **385**, 445-50.
- Stachowiak, O., Schlattner, U., Dolder, M. et Wallimann, T.** (1998). Oligomeric state and membrane binding behaviour of creatine kinase isoenzymes: implications for cellular function and mitochondrial structure. *Mol Cell Biochem* **184**, 141-51.
- Stanislas, E. et Vignais, P.** (1964). [on the Principal Toxins of *Atractylis Gummifera* L.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* **259**, 4872-5.
- Stappen, R. et Kramer, R.** (1993). Functional properties of the reconstituted phosphate carrier from bovine heart mitochondria: evidence for asymmetric orientation and characterization of three different transport modes. *Biochim Biophys Acta* **1149**, 40-8.
- Stappen, R. et Kramer, R.** (1994). Kinetic mechanism of phosphate/phosphate and phosphate/OH⁻ antiports catalyzed by reconstituted phosphate carrier from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* **269**, 11240-6.
- Stewart, M. J. et Steenkamp, V.** (2000). The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* **22**, 641-9.
- Summerhayes, I. C., Wong, D. et Chen, L. B.** (1983). Effect of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution. *J Cell Sci* **61**, 87-105.
- Summers, W. A. et Court, D. A.** (2010). Origami in outer membrane mimetics: correlating the first detailed images of refolded VDAC with over 20 years of biochemical data. *Biochem Cell Biol* **88**, 425-38.
- Thinnes, F. P. et Reymann, S.** (1997). New findings concerning vertebrate porin. *Naturwissenschaften* **84**, 480-98.
- Thomas, L., Blachly-Dyson, E., Colombini, M. et Forte, M.** (1993). Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion-selective channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5446-9.
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Trezeguet, V., Pelosi, L., Lauquin, G. J. et Brandolin, G.** (2008). The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 435-43.
- Trimpin, S. et Brizzard, B.** (2009). Analysis of insoluble proteins. *Biotechniques* **46**, 409-19.

- Tsujimoto, Y. et Shimizu, S.** (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* **7**, 1174-81.
- Tzagoloff, A.** (1982). Mitochondria. *Plenum Press, New York*.
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J. P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P. et Abramson, J.** (2008). The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17742-7.
- Ujwal, R., Cascio, D., Chaptal, V., Ping, P. et Abramson, J.** (2009). Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation. *Channels (Austin)* **3**, 167-70.
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F. E., Go, N. E., Habib, S. J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. et Rapaport, D.** (2004). Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Mol Biol Cell* **15**, 1445-58.
- Vergnolle, M. A., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L. Y. et Tokatlidis, K.** (2005). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *J Mol Biol* **351**, 839-49.
- Vignais, P. V., Vignais, P. M. et Defaye, G.** (1973). Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin). *Biochemistry* **12**, 1508-19.
- Vignais, P. V.** (1976). The mitochondrial adenine nucleotide translocator. *J Bioenerg* **8**, 9-17.
- Vissers, J. P., Hulst, W. P., Chervet, J. P., Snijders, H. M. et Cramers, C. A.** (1996). Automated on-line ionic detergent removal from minute protein/peptide samples prior to liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* **686**, 119-28.
- Vogel, H. et Jahnig, F.** (1986). Models for the structure of outer-membrane proteins of Escherichia coli derived from raman spectroscopy and prediction methods. *J Mol Biol* **190**, 191-9.
- Wales, T. E. et Engen, J. R.** (2006). Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom Rev* **25**, 158-70.
- Walker, J. E. et Runswick, M. J.** (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 435-46.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. et Eppenberger, H. M.** (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281 (Pt 1)**, 21-40.
- Wallin, E. et von Heijne, G.** (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-38.
- Wehrle, J. P. et Pedersen, P. L.** (1989). Phosphate transport processes in eukaryotic cells. *J Membr Biol* **111**, 199-213.
- Weis, D. D., Wales, T. E., Engen, J. R., Hotchko, M. et Ten Eyck, L. F.** (2006). Identification and characterization of EX1 kinetics in H/D exchange mass spectrometry by peak width analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**, 1498-509.

- Whitelegge, J. P., le Coutre, J., Lee, J. C., Engel, C. K., Prive, G. G., Faull, K. F. et Kaback, H. R.** (1999). Toward the bilayer proteome, electrospray ionization-mass spectrometry of large, intact transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10695-8.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. et Ryan, M. T.** (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo J* **20**, 951-60.
- Wohlrab, H.** (1980). Purification and reconstitution of the mitochondrial phosphate transporter. *Ann N Y Acad Sci* **358**, 364-7.
- Wohlrab, H.** (1986). Molecular aspects of inorganic phosphate transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **853**, 115-34.
- Wohlrab, H. et Briggs, C.** (1994). Yeast mitochondrial phosphate transport protein expressed in *Escherichia coli*. Site-directed mutations at threonine-43 and at a similar location in the second tandem repeat (isoleucine-141). *Biochemistry* **33**, 9371-5.
- Xu, X., Decker, W., Sampson, M. J., Craigen, W. J. et Colombini, M.** (1999). Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol* **170**, 89-102.
- Yaffe, M. P., Harata, D., Verde, F., Eddison, M., Toda, T. et Nurse, P.** (1996). Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11664-8.
- Yehezkel, G., Hadad, N., Zaid, H., Sivan, S. et Shoshan-Barmatz, V.** (2006). Nucleotide-binding sites in the voltage-dependent anion channel: characterization and localization. *J Biol Chem* **281**, 5938-46.
- Yehezkel, G., Abu-Hamad, S. et Shoshan-Barmatz, V.** (2007). An N-terminal nucleotide-binding site in VDAC1: involvement in regulating mitochondrial function. *J Cell Physiol* **212**, 551-61.
- Yu, Y. Q., Gilar, M., Lee, P. J., Bouvier, E. S. et Gebler, J. C.** (2003). Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem* **75**, 6023-8.
- Yu, Y. Q., Gilar, M. et Gebler, J. C.** (2004). A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 711-5.
- Zackova, M., Kramer, R. et Jezek, P.** (2000). Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 499-508.
- Zaid, H., Abu-Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I. et Shoshan-Barmatz, V.** (2005). The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **12**, 751-60.
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H. et Shoshan-Barmatz, V.** (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **386**, 73-83.
- Zara, V., Palmieri, F., Mahlke, K. et Pfanner, N.** (1992). The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import. *J Biol Chem* **267**, 12077-81.

- Zara, V., Ferramosca, A., Palmisano, I., Palmieri, F. et Rassow, J.** (2003). Biogenesis of rat mitochondrial citrate carrier (CIC): the N-terminal presequence facilitates the solubility of the preprotein but does not act as a targeting signal. *J Mol Biol* **325**, 399-408.
- Zara, V., Ferramosca, A., Papatheodorou, P., Palmieri, F. et Rassow, J.** (2005). Import of rat mitochondrial citrate carrier (CIC) at increasing salt concentrations promotes presequence binding to import receptor Tom20 and inhibits membrane translocation. *J Cell Sci* **118**, 3985-95.
- Zeman, I., Schwimmer, C., Postis, V., Brandolin, G., David, C., Trezeguet, V. et Lauquin, G. J.** (2003). Four mutations in transmembrane domains of the mitochondrial ADP/ATP carrier increase resistance to bongkreikic acid. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 243-56.
- Zhang, H. M., McLoughlin, S. M., Frausto, S. D., Tang, H., Emmett, M. R. et Marshall, A. G.** (2008). Simultaneous reduction and digestion of proteins with disulfide bonds for hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry. *Anal Chem* **82**, 1450-4.
- Zhang, Y. H., Yan, X., Maier, C. S., Schimerlik, M. I. et Deinzer, M. L.** (2001). Structural comparison of recombinant human macrophage colony stimulating factor beta and a partially reduced derivative using hydrogen deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry. *Protein Sci* **10**, 2336-45.
- Zhang, Z. et Smith, D. L.** (1993). Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci* **2**, 522-31.
- Zick, M., Rabl, R. et Reichert, A. S.** (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 5-19.





## Partie VI

### Travaux annexes

**(Ayant fait l'objet d'une publication)**

# The *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein: One-step purification and functional analysis *in vitro*

Martial Rey, Xavier Brazzolotto, Benjamin Clémençon, Agathe Afchain,  
Gérard Brandolin, Ludovic Pelosi*

Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (BBSI), Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant (iRTSV),  
UMR 5092 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier (UJF), CEA-Grenoble, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Received 14 December 2006; accepted 30 March 2007

Available online 10 April 2007

## Abstract

Genetic expression versus plasmidic overexpression of a functional recombinant fusion protein combining the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ADP/ATP carrier (Anc2p) and the iso-1-cytochrome *c* (Cyc1p) has been investigated, with the main aim of increasing the polar surface of the carrier to improve its crystallization properties. The gene encoding the his6-tagged fusion protein was expressed in yeast under the control of the regulatory sequences of *ScANC2* or under the control of the strong yeast *PMA1* promoter. In both cases, the chimeric carrier, Anc2-Cyc1(His6)p, was able to restore growth on a non-fermentable carbon source of a yeast strain devoid of functional ADP/ATP carrier, demonstrating its transport activity. Nevertheless, when the expression vector was used, the level of expression of Anc2-Cyc1(His6)p was no greater than that of the chimeric carrier obtained in yeast mitochondria after homologous recombination. Optimal conditions to extract and to purify Anc2-Cyc1(His6)p were determined. A series of detergents was screened for their ability to extract and to preserve *in vitro* the chimeric carrier. A rapid, single step purification of Anc2-Cyc1(His6)p was developed, using *n*-dodecyl-  -D-maltoside (DoDM) as the best detergent to solubilize the chimeric protein. Carboxyatractyloside- (CATR-) and nucleotide-binding sites were preserved in the purified protein. Moreover, the Cyc1p moiety of Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex solubilized in DoDM was still able to interact *in vitro* with the cytochrome *c* oxidase (COX), with the same affinity as yeast Cyc1p. Improved production and purification of Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex opens up new possibilities for the use of this protein in crystallographic approaches to the yeast ADP/ATP carrier. Furthermore, Anc2-Cyc1(His6)p may be an useful molecular tool to investigate *in vivo* interactions between components of the respiratory chain complexes such as COX and the proteins implicated in ATP biogenesis, such as the ATP/ADP carrier.

   2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** ADP/ATP carrier; ADP/ATP translocase; Cytochrome *c*; Mitochondria; Expression vector; *Saccharomyces cerevisiae*; Carboxyatractyloside; Bongkrekic acid

## 1. Introduction

The ADP/ATP carrier is a protein of the inner mitochondrial membrane, which in energized mitochondria exclusively catalyzes the one-to-one exchange of cytosolic ADP for ATP generated in the matrix space by oxidative phosphorylation [1]. This transport system can be blocked by specific inhibitors which bind to the carrier with high affinity and belong to two different families: atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) on the one hand, and bongkrekic acid (BA) and

**Abbreviations:** ATR, atractyloside; CATR, carboxyatractyloside; BA, bongkrekic acid; isoBA, isobongkrekic acid; N-ATR, 6'-*O*-naphthoyl-atractyloside; N-ADP, 6'-*O*-naphthoyl-ADP; DFP, di-isopropyl fluorophosphate; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; HRP, horseradish peroxidase; LAPAO, 3-laurylamido-*N,N*-dimethylpropylaminooxide; LDAO, lauryl-*N,N*-dimethyl-aminooxide; VDAC, voltage dependent anion channel; BSA, bovine serum albumin; COX, cytochrome *c* oxidase.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 34 76.

E-mail address: [ludovic.pelosi@cea.fr](mailto:ludovic.pelosi@cea.fr) (L. Pelosi).

isobongkreikic acid (isoBA) on the other. These inhibitors recognize two pre-existing conformations of the carrier protein, referred to as the CATR and BA conformations, and stabilize the carrier as the CATR- and BA-carrier complexes, which exhibit different chemical, biochemical and immunochemical reactivities. It has been suggested that the transition between the CATR and BA conformations is involved in the ADP/ATP transport mechanism [2]. Therefore, high resolution structural analysis of these two complexes would be invaluable in understanding the nucleotide transport process at the molecular level.

Recently, the 3D structure of the bovine heart ADP/ATP carrier isoform 1 (AAC1) complexed to CATR has been solved at 2.2 Å resolution [3]. Despite this progress, the molecular mechanisms in which this enzyme family is involved are still poorly understood and remain largely debated [4,5]. New structural data using mutant proteins will be necessary to establish which residues of the ADP/ATP carrier are critical for transport activity. In this respect, the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2 (Anc2p) has been the most studied [6] and therefore is the main candidate for a combination of mutagenesis and structural approaches. However, up to now, attempts to crystallize this protein have failed, probably due to the lack of hydrophilic surfaces which impairs the crystallization process [7]. To overcome this problem, we have recently engineered in our laboratory a protein (Fig. 1) resulting from the fusion at the C-terminal end of the *S. cerevisiae* Anc2p of mitochondrial iso-1-cytochrome *c* (Cyc1p) [8], a highly hydrophilic protein of known 3D structure [9] which in addition is colored and therefore suitable for crystallization attempts, including the use of lipidic cube phase [10]. Nevertheless, several problematic points were highlighted. Firstly, it was found that the amount of the resulting chimeric protein Anc2-Cyc1(His6)p produced in *S. cerevisiae* was half that of Anc2(His6)p that bears only a six-histidine tag (His6) at the C-terminal extremity [11]. Secondly, the purification procedure, which included several steps of ion exchange and affinity chromatography, was lengthy and needed to be shortened to preserve the binding capacity of the isolated carrier. Finally, other detergents were tested regarding the binding properties of the carrier since LAPAO, used previously to

purify Anc2-Cyc1(His6)p [8] and to crystallize AAC1 [3], is not able to preserve efficiently the structure of the nucleotide and inhibitor binding sites in the chimeric carrier (see this work).

In this paper, we describe the optimized conditions used to produce and to purify Anc2-Cyc1(His6)p with a view to large-scale production. Genetic expression and plasmidic overexpression of the chimeric protein were investigated, and the data obtained are discussed and compared with results from the literature. We then tested a series of detergents for their ability to extract efficiently Anc2-Cyc1(His6)p. Finally, a rapid single-step purification of Anc2-Cyc1(His6)p in the presence of DoDM was set up. Under these conditions, the purified chimeric protein was stable and was able to interact *in vitro* with cytochrome *c* oxidase (COX). These findings provide the first indication that Anc2-Cyc1(His6)p may be a high-potential tool for structural analyses of the yeast ADP/ATP carrier and for investigating the organization in the mitochondrial inner membrane of putative macromolecular multienzymatic complexes implicated in energy production [12,13].

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and immunochemicals

The protein concentration was determined using the BCA (bicinchoninic acid) reagent kit from Sigma [14]. The ECL reagent kit was from Amersham Biosciences. Ni-NTA-agarose was purchased from Qiagen. N-ATR was synthesized as described previously [15]. The detergents used for Anc2-Cyc1(His6)p extraction were from Anatrace, Sigma and Vegatec. Anatrace: *n*-octyl- $\beta$ -D-maltoside (OM), *n*-nonyl- $\beta$ -D-maltoside (NM), *n*-decyl- $\beta$ -D-maltoside (DM), *n*-undecyl- $\beta$ -D-maltoside (UnDM), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DoDM), *n*-tridecyl- $\beta$ -D-maltoside (TriDM), *n*-tetradecyl- $\beta$ -D-maltoside (TetraDM), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-glucoside (DoDG), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-sucrose (DoDS), decanoyl-*N*-methylglucamide (Mega-10) and ANAPOE-C₁₂E₈. Sigma: Emulphogen BC 720, LDAO. Vegatec: Hecameg. LAPAO was synthesized as described by Brandolin et al. [16]. Rabbit polyclonal antibodies against yeast SDS-treated-Cyc1p and yeast SDS-treated-VDAC were generously provided, by Fred Sherman (University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, USA) and by Guy Lauquin (Laboratoire de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France), respectively. The polyclonal Anc2p antibodies used were generated in rabbits against a 14-residue peptide corresponding to the C-terminal sequence (YDQLQMILFGKKFK) of Anc2p or against HTP-purified Anc2p after SDS treatment. Polyclonal antibodies against His6-tag were from US-Biological (Euromedex).

### 2.2. Bacterial and yeast strains and media

The *Escherichia coli* strain used in this work was JM109: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r*_K[−], *m*_K⁺), *relA1*, *supE44*, *D(lac-proAB)*, [*F'*], *traD36*, *proAB*, *lacI^qΔM15*

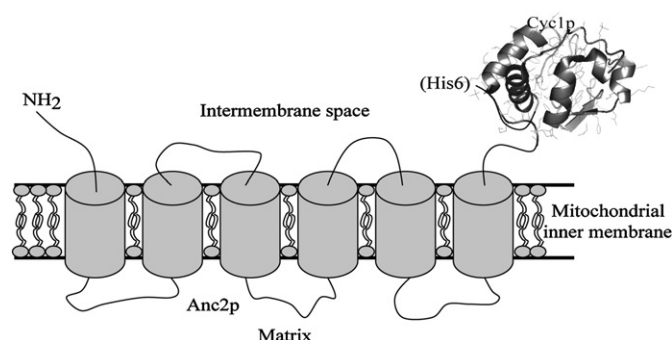


Fig. 1. Schematic representation of the postulated arrangement of Anc2-Cyc1(His6)p in the mitochondrial inner membrane deduced from the 3D structure of ANT1 [3].



## 2.7. SDS–PAGE and Western blotting

The protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Sigma) and BSA as a standard. Detergents were removed from protein fractions by overnight precipitation at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 80% (v/v) acetone and salts by subsequent washings of pellets with water. Proteins were then solubilized in SDS dissociation buffer and separated by SDS–PAGE using 12.5% polyacrylamide gels according to the Laemmli's protocol [24]. Proteins were either stained with Coomassie brilliant blue R-250 or electrotransferred onto a nitrocellulose sheet, as described previously [25]. Antibodies were used at the following dilutions: anti-Anc2p-C-ter, 1/3000; anti-SDS-treated Anc2p, 1/5000; anti-SDS-treated VDAC, 1/2000; anti-SDS-treated Cyc1p, 1:2000; and Anti-His6-tag, 1:2000. Immunorevelation of blots was performed using HRP-coupled protein A. Blots were revealed using the ECL enhanced chemiluminescence system (Amersham).

## 2.8. Redox properties of Anc2-Cyc1(His6)p and COX assays

The presence of heme in Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex was assessed in a UV-visible Shimadzu Spectrophotometer UV-1605 by measuring reduced versus oxidized visible spectra of the purified fraction treated by sodium dithionite and potassium ferricyanide, respectively. Cytochrome *c* oxidase (COX) activity was assayed according to the method described by Smith [26], in which the rate of oxidation of cytochrome *c* was monitored by a decrease in absorbance ( $\alpha$  band) at 550 nm. Assays were performed in 200  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 40  $\mu\text{M}$  of yeast Cyc1p (Sigma) or purified Anc2-Cyc1(His6)p, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4 and 1 mM EDTA. They were routinely obtained by sonication of frozen yeast mitochondria as described by Beyer [27] with few modifications [28]. Sub-mitochondrial particles SMP were diluted with a buffer containing 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA and 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ . The Cyc1p oxidation was initiated by addition of 10  $\mu\text{g}$  of total protein from SMP.

## 3. Results

### 3.1. Genomic expression versus plasmidic overexpression of Anc2-Cyc1(His6)p

The *ANC2::CYC1HT* fusion gene was constructed as described previously [8]. The corresponding gene product is a protein of 438 amino acids with a predicted molecular weight of 47.7 kDa, in which the Cyc1p is attached to the C-terminal extremity of Anc2p: Anc2-Cyc1(His6)p (Fig. 1). The fusion gene *ANC2::CYC1HT* was introduced into the genome of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain by homologous recombination at the *ANC2* locus (*JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  *ANC2::CYC1HT*) and was therefore under the control of its native promoter [8]. In another approach, in an effort to increase the amount of Anc2-Cyc1(His6)p produced in mitochondria, we tried to overexpress the chimeric protein in *Escherichia coli* BL21*

DE3 C43, but these attempts failed (Pelosi et al., unpublished data). A *S. cerevisiae* overexpression system was therefore tested by cloning the *ANC2::CYC1HT* fusion gene in a centromeric vector (pRS314-*PMA1-ADC1*) which is usually present at 1 or 2 copies per cell. This vector, which is derived from pRS314 and YEp181PALEH, bears the auxotrophy selectivity gene *TRP1*. The strong yeast *PMA1* promoter, used efficiently in yeast for heterologous expression of membrane-bound proteins, controls the foreign gene [29,30]. The resulting construction pRS314-*PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT* was used to transform the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain. The ADP/ATP transport activity of Anc2-Cyc1(His6)p was assessed by its ability to rescue the growth of the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain in a non-fermentable carbon source (YPL). We checked in control experiments that the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain transformed by empty vector pRS314-*PMA1-ADC1* was unable to grow on YPL (data not shown). The results of all complementation experiments (genomic or plasmidic) in the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain demonstrated that cells grew with lactate as the only carbon source. Interestingly, two types of clone (small- and large-sized) were obtained in solid media after transformation of the cells by the plasmid pRS314-*PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT*. The large clones tested grew in YPL with a doubling time of approximately 4 h (data not shown), whereas both the small clones and *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  *ANC2::CYC1HT* strain presented a doubling time of 7 h when cultured in the same media (data not shown). Both approaches (genomic expression or plasmidic overexpression) demonstrated that the protein expressed from *ANC2::CYC1HT* fusion gene was functional, enabling growth in lactate of an initially deficient strain.*

### 3.2. The Anc2-Cyc1(His6)p fusion protein content of yeast mitochondria

Western blot analysis was carried out on isolated mitochondrial fractions to check whether the difference in the growth rates of Anc2-Cyc1(His6)p producing cells was related to the amount of the corresponding ADP/ATP carrier (Fig. 2). In mitochondria isolated from *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  *ANC2::CYC1HT* strain, a band was detected with anti-Anc2p, anti-Cyc1p and anti-His6-tag antibodies (Fig. 2A–C, lane 1) with an apparent molecular weight (MW) of about 47 kDa, consistent with the expected molecular weight of Anc2-Cyc1(His6)p. Similar results were obtained from the mitochondrial fraction deriving from the small clones of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain harboring pRS314-*PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT* (Fig. 2A–C, lane 2). An additional band migrating at approximately 13–14 kDa MW, most probably corresponding to endogenous Cyc1p, was detected in both samples with the anti-Cyc1p antibodies (Fig. 2B, lanes 1 and 2). Immunodetected VDAC was used as a control to establish that these strains produced approximately the same content of Anc2-Cyc1(His6)p (Fig. 2A and D, lanes 1 and 2). Surprisingly, the Western blot analysis of mitochondrial extracts prepared from the large clones of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain harboring pRS314-*PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT* shows that only peptides of 35 kDa and 13–14 kDa were mainly recognized by anti-Anc2p and anti-Cyc1p*



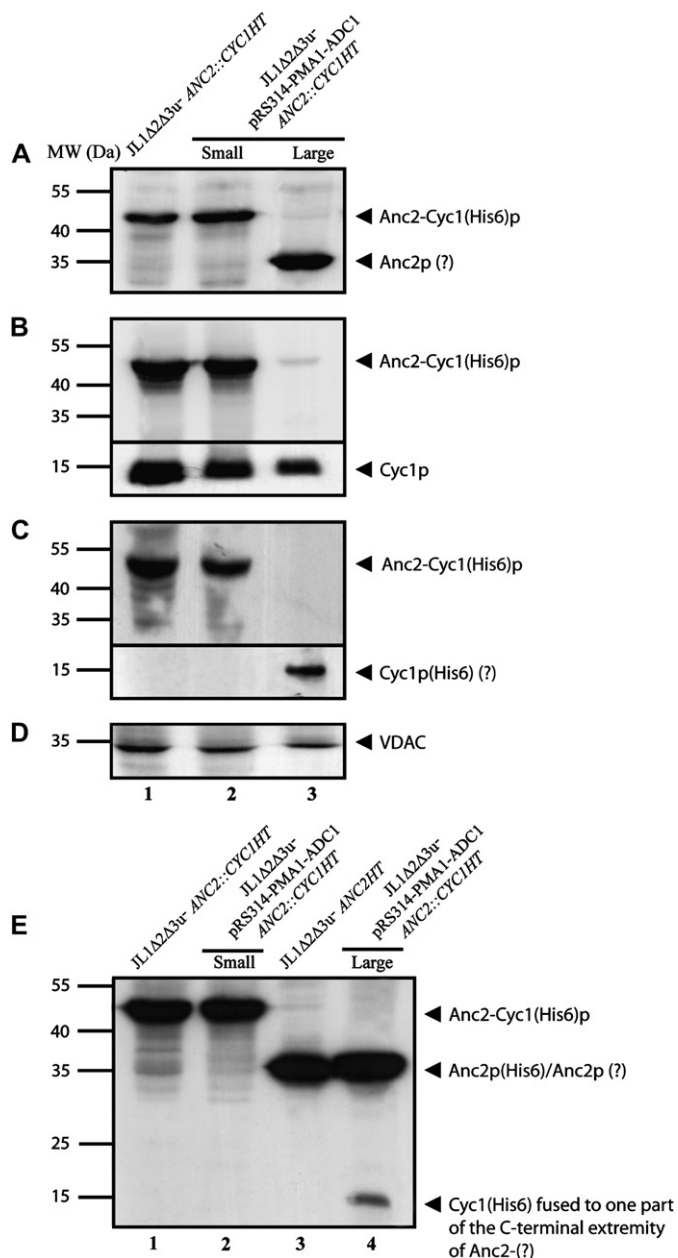


Fig. 2. Analysis of yeast mitochondria lysates by SDS–12.5% PAGE and Western blot. 20  $\mu$ g of proteins were loaded. Immunodetection of interesting polypeptides in each aliquot by polyclonal antibodies directed against (A), Anc2p, (B), Cyc1p, (C), His6-tag or (E), anti-Anc2p-C-ter (see Section 2). As a standard, a quantification of VDAC porin using polyclonal anti-VDAC antibodies (D) was performed. A to D, Genomic expression (lane 1) versus plasmidic expression (lane 2, small clone and lane 3, large clone) of Anc2-Cyc1(His6)p in JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ strains. (E) Genomic expression (lane 1) versus plasmidic expression (lane 2, small clone and lane 4, large clone); immunostaining of Anc2(His6)p produced from JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ANC2HT was used as a control (lane 3). Immune complexes were detected with ECL as described in Section 2. Polypeptides identified are indicated by arrowheads. MW, molecular weight.

antibodies, respectively (Fig. 2A and 2B, lane 3). A significant immunodetection signal was also recorded at 15 kDa with the anti-His6-tag antibodies (Fig. 2C lane 3). Unexpectedly, the apparent MW of this ADP/ATP carrier corresponds to that of Anc2p without Cyc1p and the His6-tag. In addition, we

observed that the intensity corresponding to this band was approximately twice that of the band revealed at 47 kDa, indicating a higher expression level of the cleaved chimera. The overexpression vector was extracted from the yeast strain and sequenced again. No stop codon between ANC2 and CYC1 genes was identified. We have checked that the presence of the cleaved chimera did not result from a homologous recombination of ANC2::CYC1HT gene carried by the plasmid with the corresponding disrupted ANC2 gene of the JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ strain (data not shown). Similar immunodetection patterns were obtained using antibodies directed against the C-terminal extremity of Anc2p (Fig. 2E, lanes 1–4). Immunodetection of Anc2(His6)p was used as a control (Fig. 2E, lane 3). Therefore, all forms of ADP/ATP carriers detected in this study carried the C-terminal extremity epitope. However, only the sample containing the cleaved chimeric protein (Fig. 2E, lane 4) exhibited a second significant signal near 15 kDa corresponding to a fragment of the chimeric protein carrying both the Cyc1p and the C-terminal extremity epitope of Anc2p. This finding is not yet understood and will be discussed later.

CATR-binding sites were determined in a fluorometric assay carried out with N-ATR used as a probe on isolated mitochondria from the two strains (JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ strain harboring pRS314-*PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT*, large or small clones and JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ ANC2::CYC1HT), thus allowing more accurate quantification of ADP/ATP carrier (see Section 2). The number of CATR-binding sites assayed was estimated to 110 pmol CATR/mg total mitochondrial protein for the strains producing Anc2-Cyc1(His6)p, showing that the amount of ADP/ATP carrier reached a similar level whatever the biosynthetic way of the chimeric protein. Concerning the strain producing a cleaved protein, binding sites amounted to 280 pmol CATR/mg total mitochondrial protein, confirming the higher expression level of this polypeptide. Taken together, these results demonstrate that the Anc2-Cyc1(His6)p has retained CATR binding properties. Interestingly, its expression level was not modified by the presence of the strong and consecutive *PMA1* promoter. Due to the lack of evidence for plasmidic overexpression, we decided to use the JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u⁻ ANC2::CYC1HT strain in the following experiments.

### 3.3. Extraction of Anc2-Cyc1(His6)p by detergents

A series of detergents was screened for their ability to extract and to preserve the CATR-binding capacity of the isolated chimeric carrier Anc2-Cyc1(His6)p. Mitochondrial membrane-bound proteins were solubilized in the presence of 2% (w/v) detergent at a protein concentration of 10 mg/ml and binding experiments were carried out with N-ATR and N-ADP (data not shown) in the detergent-extracts. Detergents such as MEGA-10 (glucamide family), ANAPOE-C₁₂E₈ and Emulphogen BC 720 (polyoxyethylene family), LAPAO and LDAO (aminoxide family) and Hecameg (alkylglucoside family) solubilized the polypeptide (data not shown) but were unable to preserve the CATR-binding sites of the chimeric carrier (Fig. 3A). As observed previously for Anc2(His6)p

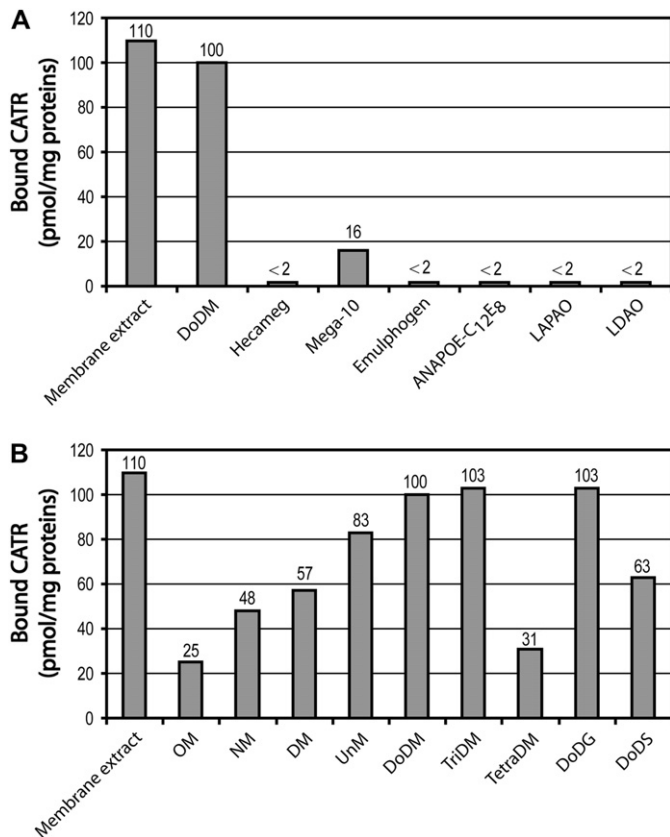


Fig. 3. (A) Screening of a series of detergents belonging to different families for their ability to extract and preserve the CATR binding capacity of Anc2-Cyc1(His6)p. (B) Screening of a series of alkylglycosides: investigation of the optimal number of carbons in the aliphatic chain and test of several kinds of hydrophilic glycosidic heads. CATR-binding was assayed in the supernatant obtained after extraction of membrane-bound proteins with various detergents tested at a final concentration of 2% (w/v). Specific binding of CATR on mitochondrial lysates is expressed as pmol of CATR fixed per mg of proteins. CATR-binding was assessed in the mitochondrial membrane extract as a standard.

[8,11], DoDM (alkylglycoside family) efficiently solubilized Anc2-Cyc1(His6)p. Recognition of specific ligands was retained since 91% of the CATR binding sites were recovered in mitochondrial lysates. Based on these results, and in order to optimize the extraction conditions, the effect of the length of the aliphatic chain and of the nature of the hydrophilic glycosidic head in detergent molecules were tested by following the number of CATR-binding sites (Fig. 3B). Interestingly, within the alkylmaltoside family with aliphatic chains extending from 8 to 14 carbon atoms, the best results were obtained with DoDM and TriDM which have a longer side chains (12 and 13 carbon atoms, respectively). The length of the alkyl chain is therefore critical to recover the highest amount of CATR-binding sites. In the same way, the most efficient of the detergents of the dodecylglycoside family that were tested in this work (DoDG and DoDM) are both characterized by a hydrophilic head with a reducing glucosidic residue carrying the alkyl chain. In contrast, the presence of a non-reducing disaccharide head, such as sucrose in DoDS, did not allow a full recovery of CATR binding sites (Fig. 3B). Due to their poor solubility at low temperature, DoDG and TriDM were

excluded from this work and DoDM was therefore used as the more suitable detergent in the following experiments.

### 3.4. One-step purification of Anc2-Cyc1(His6)p

In a previous study, purification of Anc2-Cyc1(His6)p was performed by combining ion-exchange chromatography and IMAC in LAPAO [8]. This experimental procedure proved to be unsuitable, since we showed in this work that LAPAO is not effective in conserving the functional structure of the chimeric carrier *in vitro*. A one-step IMAC procedure, using DoDM as the detergent, was therefore developed (see Section 2). The optimal ratio of Ni-NTA resin-to-total DoDM-extracted mitochondrial proteins was very high (1 ml of Ni-NTA resin to 15 mg of total proteins), as also observed for Anc2(His6)p [11]. The results obtained are presented in Fig. 4. Purification of fusion carrier was monitored by SDS-PAGE and Western blot. A single band of approximately 47 kDa corresponding to the expected size for Anc2-Cyc1(His6)p was detected either after protein staining (Fig. 4, lane 2) or by immunodetection using antibodies directed against either Anc2p (Fig. 4, lane 3) or Cyc1p (Fig. 4, lane 4). Some high molecular aggregates appeared in Fig. 2, lane 2, probably due to incomplete solubilization of proteins. Isolated, unliganded, IMAC-purified Anc2-Cyc1(His6)p was unable to bind CATR. Nevertheless, much better recovery of binding sites was obtained when the chimeric protein was solubilized and purified in the presence of N-ATR, which seems to play a role in the stabilization and protection of CATR binding sites of Anc2-Cyc1(His6)p during the IMAC purification step. Similar results were obtained using an N-ADP probe (data not

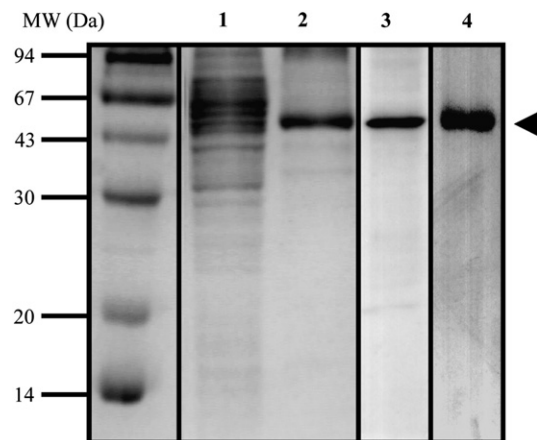


Fig. 4. Purification of Anc2-Cyc1(His6)p. The Anc2-Cyc1(His6)p complexed with CATR or N-ATR was solubilized from mitochondria with DoDM and chromatographed on Ni-NTA resin. The protein fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (lanes 1 and 2) or immunoblotting, using anti-Anc2p (lane 3) or anti-Cyc1p (lane 4) antibodies. 10 µg of protein was loaded in each lane as judged by the BCA assay of the samples. Immune complexes were detected with ECL as described in Section 2. Lane 1, crude mitochondrial extract; lanes 2–4, fraction eluted from Ni-NTA resin by competition with 500 mM EDTA. The arrowhead corresponds to Anc2-Cyc1(His6)p. MW, molecular weights.



shown). These results suggest that the presence of the Cyc1 moiety did not restrict the accessibility of the CATR- and nucleotide-binding sites in isolated Anc2-Cyc1(His6)p. The purification yield of the Anc2-Cyc1(His6)p or Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex was approximately 90–95% with respect to the amount of carrier evaluated according to the number of CATR-binding sites in mitochondrial extracts, assuming that one CATR molecule binds/carrier dimer and according to the protein assay (BCA) in the purified fraction.

### 3.5. Redox properties of the purified Anc2-Cyc1(His6)p

The presence of heme in the chimeric protein-CATR complex purified under our conditions was assessed by spectrophotometry. In the reduced state, the visible spectrum of the isolated chimeric protein displayed  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  absorption bands characteristic of Cyc1p, centered at 550, 520, 416 and 315 nm, respectively (Fig. 5). Upon oxidation, in the presence of micromolar concentrations of potassium ferricyanide, the absorption of the  $\alpha$  and  $\beta$  bands decreased significantly, which is consistent with the lower values of the corresponding molar extinction coefficients in the oxidized state [31]. This effect was in agreement with the shift in the maximum absorption of the  $\gamma$  and  $\delta$  bands from 416 and 315 nm to 410 and 360 nm, respectively [31] (Fig. 5). The heme content of the purified Anc2-Cyc(His6)p fusion protein was estimated. The Cyc1p-to-Anc2-Cyc(His6)p molar ratio in the isolated fusion protein gave a value equal to 0.9 on the basis of Cyc1p content calculated from the absorbance of the  $\gamma$  band (in the reduced state) and from the protein content determined by BCA quantification. This result is in agreement with the values obtained previously by Dassa et al. (2005).

The redox properties of the isolated Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex in DoDM demonstrate the proper folding of the Cyc1p moiety. In addition, we checked that the latter was also able to interact and thus be oxidized by the COX

prepared from beef sub-mitochondrial particles (SMP). It is well known that COX enzymatic activity is activated by high concentrations of DoDM [32], so oxidation of yeast Cyc1p by SMP was therefore assayed as a standard in presence of DoDM (see Section 2). Both proteins were tested at similar concentrations. With Cyc1p or Anc2-Cyc1(His6)p as substrates, the COX presented a specific activity corresponding to  $1.03 \pm 0.08$  or  $1.42 \pm 0.11$  nmol of oxidated Cyc1p/min/mg of SMP, respectively. Therefore, the enzymatic oxidation mechanism of Cyc1p in the chimeric protein solubilized in DoDM was not affected, demonstrating that the presence of Anc2p moiety did not restrict the accessibility of Cyc1p to the COX. Moreover, the oxidation rate of Cyc1(His6)p in Anc2-Cyc1(His6)p was comparable to that of pure Cyc1p measured in the presence of equivalent concentration of DoDM.

## 4. Discussion

The recent elucidation of the 3D structure of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier has shed some light on features of the nucleotide transport and CATR inhibition processes [3]. However, additional data are required to determine the conformational changes of the carrier occurring during nucleotide transport. In this way, structural determination of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier is of major interest as a tool to define the critical role of strategic residues by genetic engineering approaches. Isoform 2 of yeast ADP/ATP carrier (Anc2p) has been the most studied carrier, but 3D crystallography attempts with Anc2p have so far failed. In order to improve the crystallization ability of Anc2p, we have recently produced a chimeric protein, Anc2-Cyc1(His6)p, which has increased hydrophilic domains, thus providing more potential crystallization contacts [8].

In a previous study, we showed that the yield of recovered Anc2-Cyc1(His6)p in mitochondria was lower than that of Anc2(His6)p when the fusion gene *ANC2::CYC1HT* was introduced into the genome of *JL1Δ2Δ3u⁻* strain by homologous recombination at the *ANC2* locus [8]. A possible explanation is that the *ANC2* promoter was not strong enough under conditions of respiratory metabolism. In order to increase the amount of chimeric protein, a plasmidic overexpression system was developed based on another strong promoter, the yeast *PMA1* promoter, which has already been used with success to express in yeast several membrane-bound proteins such as the mitochondrial arginine–ornithine carrier from *Arabidopsis thaliana* [29]. The lactococcal expression system has not been followed up. Indeed, the yeast ADP/ATP carrier Anc2p is not better expressed due to several reasons: firstly, its N-terminal region is not adapted to the membrane insertion process of *Lactococcus lactis* [33]; secondly, the low usage of codons, such as AGA (Arg) and ACC (Thr) which are present in *ANC2* gene, is another potential limitation of the lactococcal expression system [34]. In summary, yeast ADP/ATP carrier was expressed in lactococcal membranes to levels similar to those observed for the carrier in native yeast mitochondria [35]. Unfortunately, despite obtaining several clones from

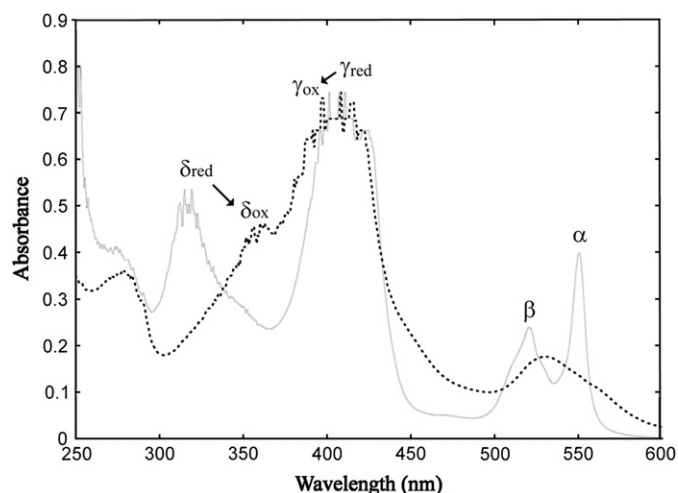


Fig. 5. Spectra of IMAC-purified Anc2-Cyc1(His6)p in the oxidized state (dashed line) and in the reduced state (solid line). The protein concentration was estimated to be 40  $\mu$ M.

the JL1Δ2Δ3u[−] strain carrying the plasmid pRS314-*PMAl-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we were unable to increase significantly the amount of chimeric carrier in the mitochondrial extracts. Interestingly, despite the use of two types of strong promoter (native or *PMAl*) which present different strengths (see <http://www.yeastgenome.org/>), the same content of Anc2-Cyc1(His6)p was expressed according to the Western blot analysis (Fig. 2, lanes 1 and 2) and to the number of CATR-binding sites calculated from the mitochondrial extracts (110 pmol CATR/mg total mitochondrial protein for the both samples). The expression of the chimera was thus independent of the type of promoter used. The protein import machinery of mitochondria is therefore probably directly involved in this limitation. Several steps in this pathway may be involved, including the following: the binding of the chimeric carrier precursor to cytosolic chaperones which prevent aggregation in the cytosol of the hydrophobic carrier proteins of the inner membrane [36]; its translocation across the outer mitochondrial membrane catalyzed by the translocase of the outer membrane (TOM) complex [36]; its association by a complex of small Tim proteins in the intermembrane space; and finally, its delivery to the protein insertion machinery of the inner membrane [36]. The import of Anc2p seems to be directly correlated to its hydrophilic character, since a covalent tandem dimer of Anc2p and the heterochimeric Anc2p-phosphate carrier were imported in the mitochondria in a similar fashion to Anc2p [37]. Indeed, Anc2p is more efficiently imported than its His6-tagged form [11]. Coupling of the Cyc1(His6)p to the carrier decreased by two thirds the amount of carrier imported into mitochondria [8] despite the use of an overexpression system (this work). Furthermore, the import of Cyc1p into the mitochondrial intermembrane space is not well understood at a mechanistic level. Although the precursor apoCyc1p can insert into protein-free lipid bilayers [38], it requires the purified TOM complex to be translocated into proteoliposomes [39]. The complexity of import mechanisms makes it difficult to identify which is the limiting step of the import machinery for the chimeric ATP/ADP carrier.

In one family of clones obtained after transformation of JL1Δ2Δ3u[−] strain with pRS314-*PMAl-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we observed a cleaved chimeric protein, the size of which corresponded roughly to that of Anc2p without the Cyc1(His6)p. The most likely explanation for this is that the chimeric protein is actually toxic to cells. This would lead to selective pressure for secondary chromosomal mutations in transformed strains, such as mutations in protease encoding genes, leading to cleavage. Due to the homogeneity of the 15 kDa bands observed with the anti-Anc2p-C-ter and the anti-His6-tag antibodies (see Fig. 2C and E, respectively), only one site of cleavage is expected. It would be located within the C-terminal region of Anc2p, since peptides of 35 kDa and 15 kDa were immunodetected in the mitochondrial extracts with anti-Anc2p-C-ter antibodies. The portion of the cleaved protein corresponding to the ATP/ADP carrier was more efficiently imported into the inner membrane, confirming that the addition of hydrophilic segments impairs the import of the carrier. Concerning the large clones harboring

pRS314-*PMAl-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we suggest that the inner membrane-bound localization of Cyc1p in the chimeric protein might enhance its N-terminal degradation due to the amphipathic structure of Anc2-Cyc1(His6)p. Indeed, when the dispensable N-terminus of the holo-form of Cyc1p is replaced by hydrophobic peptides, a rapid degradation of the correspondingly modified Cyc1p occurs [40]. The authors of that work suggested that the resulting new amphipathic structures led to a stronger association of the Cyc1p with the inner mitochondrial membrane, which in turn made the protein more accessible to membrane-associated mitochondrial proteases such as the AAA proteases. These proteases regulate the biogenesis of respiratory chain complexes and prevent the accumulation of non-assembled subunits [41]. According to this model, we can expect that in such clones, the chimeric protein localized in the inner membrane would be more sensitive to the respiratory chain complex-associated proteases, possibly due to a secondary chromosomal mutation. The C-terminal region of Anc2p would be therefore recognized in these conditions and hydrolyzed. Identification of the cleavage sites is in progress in our laboratory.

In this study, optimal conditions to extract and to purify Anc2-Cyc1(His6)p were determined. DoDM was found to be a better compromise to preserve and to solubilize efficiently the chimeric protein. DoDM is also one of the best detergents, with *n*-octyl-β-D-glucoside and LDAO, for crystallizing membrane-bound proteins (see Membrane Protein Data Bank, <http://www.mpdb.ul.ie/>). Rapid, one-step purification of the Anc2-Cyc1(His6)p-N-ATR complex was achieved. Additionally, the yield of purification was increased from 50% [8] to approximately 95%. We have proved, using N-ATR or N-ADP probes, that the CATR- and nucleotide-binding sites are preserved in the purified protein. Moreover, we have demonstrated that the Cyc1p moiety of the Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex solubilized in DoDM was still able to interact *in vitro* with COX over the same range of affinity as Cyc1p and was thus not masked by the detergent. In summary, the purification of Anc2-Cyc1(His6)p was much improved and will allow us to attempt the crystallization of the Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex.

Protein–protein interactions between ATP/ADP carrier and VDAC in mammal mitochondria have been shown to occur [42], and *in vitro* interactions between VDAC from yeast and subunit I of human COX have also been demonstrated [43]. Nevertheless, there is currently no evidence for protein–protein interactions between Anc2p and yeast COX. For this purpose, Anc2-Cyc1(His6)p will be used as a tool to investigate these putative interactions *in vivo* and will open interesting perspectives in studying the dynamic structure of the outer- and inner-membrane enzymatic complexes in yeast mitochondria [13] via the crystal junctions [12].

## Acknowledgments

We thank Patrice Catty (Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CEA de Grenoble, France) for assistance in yeast molecular biology and for the generous gift of

the YEplac181PALEH plasmid. M.R., X.B. and A.A. are supported by fellowships from the Université Joseph Fourier (UJF), the French Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and the Commissariat à l'Etude Atomique (CEA), respectively. This work was supported by grants from the UJF, CNRS and CEA.

## References

- [1] C. Dahout-Gonzalez, H. Nury, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, E. Pebay-Peyroula, G. Brandolin, Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Physiology*, Bethesda, 2006, 21242–249.
- [2] G. Brandolin, A. Le Saux, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane, *J. Bioenerg. Biomembr.* 25 (1993) 459–472.
- [3] E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, *Nature* 426 (2003) 39–44.
- [4] H. Nury, C. Dahout-Gonzalez, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 713–741.
- [5] L. Bamber, M. Harding, P.J. Butler, E.R. Kunji, Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 16224–16229.
- [6] C. Fiore, V. Trezeguet, A. Le Saux, P. Roux, C. Schwimmer, A.C. Dianoux, F. Noel, G.J. Lauquin, G. Brandolin, P.V. Vignais, The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects, *Biochimie* 80 (1998) 137–150.
- [7] C. Ostermeier, H. Michel, Crystallization of membrane proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 697–701.
- [8] E.P. Dassa, C. Dahout-Gonzalez, A.C. Dianoux, G. Brandolin, Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 358–369.
- [9] G.V. Louie, G.D. Brayer, High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome *c* and comparisons with other eukaryotic cytochromes *c*, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 527–555.
- [10] P. Nollert, J. Navarro, E.M. Landau, Crystallization of membrane proteins in cubo, *Methods Enzymol.* 343 (2002) 183–199.
- [11] C. Fiore, V. Trezeguet, P. Roux, A. Le Saux, F. Noel, C. Schwimmer, D. Arlot, A.C. Dianoux, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region, *Protein Expr. Purif.* 19 (2000) 57–65.
- [12] R.W. Gilkerson, J.M. Selker, R.A. Capaldi, The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.* 546 (2003) 355–358.
- [13] H. Schagger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783.
- [14] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goekke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [15] F. Boulay, G. Brandolin, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Synthesis and properties of fluorescent derivatives of atractyloside as potential probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein, *Anal. Biochem.* 128 (1983) 323–330.
- [16] G. Brandolin, J. Doussiere, A. Gulik, T. Gulik-Krzywicki, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 592 (1980) 592–614.
- [17] S.N. Cohen, A.C. Chang, L. Hsu, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2110–2114.
- [18] T. Drgon, L. Sabova, N. Nelson, J. Kolarov, ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* 289 (1991) 159–162.
- [19] C. De Marcos Lousa, V. Trezeguet, A.C. Dianoux, G. Brandolin, G.J. Lauquin, The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast, *S. cerevisiae*, *Biochemistry* 41 (2002) 14412–14420.
- [20] D. Gietz, A. St Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1425.
- [21] R.S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 122 (1989) 19–27.
- [22] R.D. Gietz, A. Sugino, New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, *Gene* 74 (1988) 527–534.
- [23] G. Daum, P.C. Bohni, G. Schatz, Import of proteins into mitochondria. Cytochrome *b2* and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13028–13033.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [25] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [26] L. Smith, Spectrophotometric assay of cytochrome *c* oxidase, *Methods Biochem. Anal.* 2 (1955) 427–434.
- [27] R.E. Beyer, D.L. Crankshaw, J.M. Kuner, Induction of respiratory control in submitochondrial particles by dicyclohexylcarbodiimide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 758–763.
- [28] G.J. Lauquin, C. Villiers, J.W. Micejda, L.V. Hryniewiecka, P.V. Vignais, Adenine nucleotide transport in sonic submitochondrial particles. Kinetic properties and binding of specific inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 460 (1977) 331–345.
- [29] E. Catoni, M. Desimone, M. Hilpert, D. Wipf, R. Kunze, A. Schneider, U.I. Flugge, K. Schumacher, W.B. Frommer, Expression pattern of a nuclear encoded mitochondrial arginine-ornithine translocator gene from *Arabidopsis*, *BMC Plant Biol.* 3 (2003) 1.
- [30] U. Romer, H. Schrader, N. Gunther, N. Nettelstroth, W.B. Frommer, L. Elling, Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum*, L. for carbohydrate engineering, *J. Biotechnol.* 107 (2004) 135–149.
- [31] R. Lemberg, J. Barrett, Cytochromes, Academic Press, London, New York, 1973.
- [32] P. Rosevear, T. VanAken, J. Baxter, S. Ferguson-Miller, Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* 19 (1980) 4108–4115.
- [33] E.R. Kunji, K.W. Chan, D.J. Slotboom, S. Floyd, R. O'Connor, M. Monne, Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 546–551.
- [34] A. Fuglsang, Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 285–291.
- [35] E.R. Kunji, D.J. Slotboom, B. Poolman, *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 97–108.
- [36] N. Wiedemann, A.E. Frazier, N. Pfanner, The protein import machinery of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14473–14476.
- [37] V. Postis, C. De Marcos Lousa, B. Arnou, G.J. Lauquin, V. Trezeguet, Subunits of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier: cooperation within the dimer, *Biochemistry* 44 (2005) 14732–14740.
- [38] M.E. Dumont, Mitochondrial Import of Cytochrome *c*, JAI Press, Greenwich, CT, 1996, 103–126.
- [39] N. Wiedemann, V. Kozjak, T. Prinz, M.T. Ryan, C. Meisinger, N. Pfanner, K.N. Truscott, Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome *c*: a unique relationship to the TOM machinery, *J. Mol. Biol.* 327 (2003) 465–474.

- [40] X. Chen, R.P. Moerschell, D.A. Pearce, D.D. Ramanan, F. Sherman, Enhanced mitochondrial degradation of yeast cytochrome *c* with amphipathic structures, *Curr. Genet.* 47 (2005) 67–83.
- [41] H. Arlt, G. Steglich, R. Perryman, B. Guiard, W. Neupert, T. Langer, The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease, *EMBO J.* 17 (1998) 4837–4847.
- [42] F. Verrier, A. Deniaud, M. Lebras, D. Metivier, G. Kroemer, B. Mignotte, G. Jan, C. Brenner, Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis, *Oncogene* 23 (2004) 8049–8064.
- [43] I. Roman, J. Figys, G. Steurs, M. Zizi, *In vitro* interactions between the two mitochondrial membrane proteins VDAC and cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* 44 (2005) 13192–13201.

# Conformational Dynamics of the Bovine Mitochondrial ADP/ATP Carrier Isoform 1 Revealed by Hydrogen/Deuterium Exchange Coupled to Mass Spectrometry^{*[5]}

Received for publication, May 19, 2010, and in revised form, July 27, 2010. Published, JBC Papers in Press, August 30, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.146209

Martial Rey^{‡1}, Petr Man^{§¶2}, Benjamin Cléménçon[‡], Véronique Trézéguet^{||}, Gérard Brandolin[‡], Eric Forest^{§3}, and Ludovic Pelosi^{‡4}

From the [‡]Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, UMR 5092 CNRS-Commissariat à l'Energie Atomique-Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble Cedex 9, France, the [§]Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier, F-38027 Grenoble 1, France, the [¶]Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic, and the ^{||}Laboratoire de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS-Université Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint-Saëns, F-33077 Bordeaux Cedex, France

The mitochondrial adenine nucleotide carrier (Ancp) catalyzes the transport of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane, thus playing an essential role in cellular energy metabolism. During the transport mechanism the carrier switches between two different conformations that can be blocked by two toxins: carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid. Therefore, our understanding of the nucleotide transport mechanism can be improved by analyzing structural differences of the individual inhibited states. We have solved the three-dimensional structure of bovine carrier isoform 1 (bAnc1p) in a complex with CATR, but the structure of the carrier-bongkreikic acid complex, and thus, the detailed mechanism of transport remains unknown. Improvements in sample processing in the hydrogen/deuterium exchange technique coupled to mass spectrometry (HDX-MS) have allowed us to gain novel insights into the conformational changes undergone by bAnc1p. This paper describes the first study of bAnc1p using HDX-MS. Results obtained with the CATR-bAnc1p complex were fully in agreement with published results, thus, validating our approach. On the other hand, the HDX kinetics of the two complexes displays marked differences. The bongkreikic acid-bAnc1p complex exhibits greater accessibility to the solvent on the matrix side, whereas the CATR-bAnc1p complex is more accessible on the intermembrane side. These results are discussed with respect to the structural and biochemical data available on Ancp.

Import and export of metabolites across mitochondrial membranes are vital processes that are highly controlled and regulated at the level of the inner mitochondrial membrane. Proteins of the mitochondrial carrier family (MCF)⁵ are embedded in this membrane, and each member of the family achieves the selective transport of specific metabolites (1). Among these, the ADP/ATP carrier (Ancp) transports ADP into the mitochondrial matrix and exports newly synthesized ATP toward the cytosol. Mainly due to its natural abundance, the ADP/ATP carrier is the best characterized within the MCF (2). The mitochondrial ADP/ATP exchange process can be blocked by two specific inhibitors, namely carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid (BA). CATR and BA bind with high affinity to two distinct pre-existing conformations of the carrier referred to as CATR and BA conformations, respectively, resulting in the formation of stable CATR- and BA-carrier complexes. It was suggested that the transition between the CATR and BA conformations is similar to that involved in the ADP/ATP transport (2).

Members of MCF share common features, *i.e.* similar molecular masses of about 30 kDa, a so-called tripartite organization consisting of three sequence repeats of about 100 amino acid residues each, and the presence of the conserved motif PX(D/E)XX(K/R) in each repeat (1). Additionally, the Ancp have a common signature sequence, RRRMMM, that is absent in other MCF members (3). The intrinsic mechanisms of ADP/ATP transport, nucleotide recognition, and Ancp conformational changes have been widely investigated mainly with the bovine isoform 1 (bAnc1p) and the *Saccharomyces cerevisiae* isoform 2 (ScAnc2p). The large body of biochemical and biophysical data available demonstrated that CATR- and BA-carrier complexes display distinct structural features (4).

Understanding the mechanism of transport proteins in biological membranes at the molecular level requires high resolution structural information that is usually obtained from x-ray crystallography and/or NMR spectroscopy studies. The three-

^{*} This work was supported by grants from the University Joseph Fourier, the CNRS, and the Commissariat à l'Energie Atomique (programme Signalisation et Transport Membranaires).

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

¹ Supported by a fellowship from the Université Joseph Fourier.

² Supported by the Institutional Research Concept of the Institute of Microbiology and by a fellowship from the Commissariat à l'Energie Atomique.

³ To whom correspondence may be addressed: LSMP, IBS, UMR 5075 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, France. Tel.: 0033-4-38-78-34-03; Fax: 0033-4-38-78-54-94; E-mail: [eric.forest@ibs.fr](mailto:eric.forest@ibs.fr).

⁴ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 0033-4-38-78-34-76; Fax: 0033-4-38-78-51-85. E-mail: [ludovic.pelosi@cea.fr](mailto:ludovic.pelosi@cea.fr).

⁵ The abbreviations used are: MCF, mitochondrial carrier family; CATR, carboxyatractyloside; BA, bongkreikic acid; IMS, intermembrane space; Ancp, ADP/ATP carrier; bAnc1p, bovine isoform 1 Ancp; ScAnc2p, yeast isoform 2 Ancp; HDX, hydrogen/deuterium exchange; ESI, electrospray ionization.



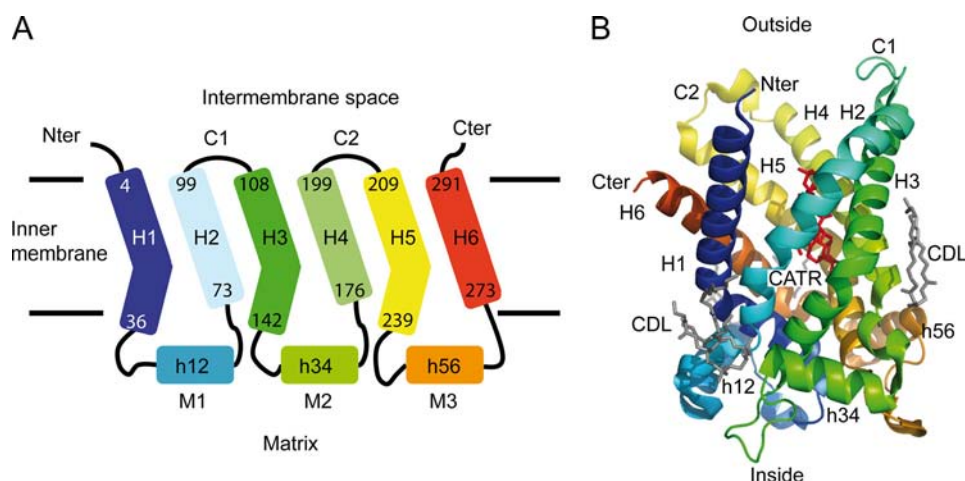


FIGURE 1. **Architecture of bAnc1p in the membrane adapted from Pebay-Peyroula *et al.* (5).** A, shown is a schematic diagram of the carrier secondary structure. Transmembrane helices, matrix helices, IMS loops, and matrix loops are labeled *H*, *h*, *c* and *M*, respectively. The helices comprise the following residues: 4–36 (*H1*), 53–63 (*h12*), 73–99 (*H2*), 108–142 (*H3*), 156–166 (*h34*), 176–199 (*H4*), 209–238 (*H5*), 253–263 (*h56*), 273–291 (*H6*). Odd-numbered helices are kinked by the presence of prolines (Pro²⁷, Pro¹³², Pro²²⁹). B, shown is a ribbon diagram of the carrier viewed from the side. The structure is colored according to the sequence, blue (N terminus) to red (C terminus). Membrane boundaries are drawn in agreement with the hydrophobic segments of the helices. The three-dimensional structure of bAnc1p covers residues 2–293 (Protein Data Bank code 1OCK). Three cardiolipin molecules (*CDL*) and one molecule of CTR are represented as sticks in gray and red, respectively. The ribbon diagram was drawn with the program PyMOL Version 0.99, DeLano Scientific LLC.

dimensional structure of bAnc1p locked with CTR has been solved at 2.2 Å resolution by x-ray crystallography (5). In this structure the six transmembrane helices of bAnc1p called H1 to H6 form a cavity with a deep, cone-shaped depression accessible only from the cytosolic side (see Fig. 1). Binding of CTR in the cavity blocks Ancp, and numerous studies have suggested that CTR- and ADP-binding sites overlap at least partially (4). In each odd-numbered helix, the proline of the MCF motif introduces a sharp kink, which is suggested to act as a hinge in the straightening out the helices when bAnc1p is open to the matrix side (5). The connections between the even- and odd-numbered helices are made by the intermembrane space (IMS) loops C1 and C2 and by matrix loops M1, M2, and M3 including short  $\alpha$ -helical stretches h12, h34, and h56, respectively (see Fig. 1). The latter are parallel to the membrane surface and strengthen the closed conformation of the CTR-carrier complex on the matrix side (Fig. 1). In contrast to the CTR-bound bAnc1p, the structure of the bovine BA inhibited form still remains unknown. Its characterization, however, would significantly extend our understanding of the ADP/ATP transport mechanism.

Hydrogen/deuterium exchange (HDX) experiments provide information on the local accessibility of the solvent to proteins. Their monitoring with NMR spectroscopy (HDX-NMR) or mass spectrometry (HDX-MS) has proven particularly valuable in characterizing the structure of partially folded states of soluble proteins during a folding reaction (6–8). HDX experiments have also been recently performed on soluble amphitropic proteins interacting with lipid vesicles, allowing characterization of different conformations of the proteins bound to lipid vesicles and localization of the interacting regions of the proteins at a resolution of a single amino acid residue for HDX-NMR (9–11) or a peptide scale for HDX-MS (9, 12–15). Compared with NMR, MS provides information at

lower resolution but has no constraints with respect to the molecular weight of the protein. The resolution can be improved significantly if the protein is digested by different acidic proteases (12, 16–18). Up to now, HDX-MS studies of intrinsic membrane proteins in conditions close to the native state have remained anecdotal because of the difficulty to handle detergents. To overcome this problem, the detergent needs to be separated from the peptide mixture obtained after the proteolysis step. In non-native experiments, strong ionic detergent, such as sodium dodecyl sulfate, could be precipitated by adding potassium salt in the medium (19). However, in native experiments, the detergent used to maintain the membrane protein in solution cannot be easily precipitated. The detergent could be separated from

the peptides during the reversed phase chromatography (20, 21) or replaced by liposomes or more recently by lipid nanodiscs that mimic the lipid bilayer (22). Nevertheless, the residual detergent peaks may overlap with the peptides peaks and alter the collected data. To fully remove the detergent, we recently developed a method based on solid-phase extraction with chlorinated solvents (23). Its main advantages are its efficiency, its compatibility with HDX-MS, and the ease of automation.

In this paper we have employed HDX-MS and this new method to study the functional dynamics of an integral membrane protein, bAnc1p, extracted in Triton X-100 by analyzing CTR- and BA-complexes. Not only are our results consistent with previous structural and biochemical work on bAnc1p, but they also provide new insights into the conformational state of the BA-bAnc1p complex in detergent solution and, thus, into the ADP/ATP translocation mechanism across the inner membrane.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals**—BA was prepared as previously described (24). Hydroxylapatite was from Bio-Rad. The polyclonal antibodies used in this work were generated in rabbits against bovine SDS-treated bAnc1p (25). CTR, commercial proteases (pepsin, type XVIII protease, and type XVIII protease), and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma. Recombinant type XVIII protease was obtained as described in Rey *et al.* (16). Trifluoroacetic acid, acetonitrile, and dichloromethane were purchased from Sigma, Carlo Erba Reagenti, and Riedel de Haën, respectively.

**Purification of bAnc1p with Triton X-100**—The ADP/ATP carrier was isolated from beef heart mitochondria as a CTR-carrier complex or a BA-carrier complex in the presence of

Triton X-100 detergent (1% (w/v) final concentration) according to the procedure described by Brandolin *et al.* (26).

**bAnc1p Digestion**—All protein digestions in solution were performed in an ice bath at 0 °C. Protease solutions were prepared in 20 mM glycine, pH 2.5, and cooled to 0 °C. The ADP/ATP carrier was digested in 20 mM glycine, pH 2.5, for 2 min using a protease/substrate ratio of 1:1 (w/w) for pepsin and recombinant type XVIII protease and 10:1 (w/w) and 17:1 (w/w) for commercial proteases type XIII and XVIII, respectively. Online digestion of bAnc1p in the presence of 1 M guanidinium chloride (final concentration) was performed in an ice bath at 0 °C using a column packed with pepsin immobilized on a POROS-20AL resin (16).

**SDS-PAGE and Western Blotting**—The protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Sigma) and BSA as a standard. For SDS-PAGE, samples were prepared as described in Brandolin *et al.* (25). Antibodies directed against SDS-treated bAnc1p were used at a 1/1000 final dilution. Immunodetection was performed using HRP-coupled protein A and the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Biosciences).

**H/D Exchange of bAnc1p Complexes**—After purification and concentration of the ADP/ATP carrier-inhibitor complexes above 5 mg protein/ml, the HDX reaction was initiated by a 10× dilution into deuterated buffer containing 10 mM MOPS-NaOH, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.8, and performed at 4 °C. Time-course of the H/D exchange was followed over a 10,000-s period by sequential withdrawing of 80 µl of deuterated samples that were immediately added to 20 µl of quenching buffer (1 M glycine-HCl, pH 2.5), rapidly mixed, and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were stored in liquid nitrogen until they were analyzed.

**High Pressure Liquid Chromatography Peptide Separation**—Peptides obtained by protein digestion in solution or online procedures were loaded onto a peptide MicroTrap column (Michrom Bioresources, Auburn, CA). Samples were desalted by washing with solution A, and the detergent and lipids were removed (23). After re-equilibration of the trap column, gradient elution was started. The peptides were separated on a C18 reversed phase column (1 × 100 mm, Jupiter; Phenomenex) using a linear gradient from 15 to 40% (v/v) solution B in 20 (deuterated samples) to 40 min (peptide mapping) followed by 40% (v/v) solution B for 5 min at a flow rate of 50 µl·min⁻¹. Before the separation the column was equilibrated with 15% (v/v) B. Solution A was 0.03% (v/v) trifluoroacetic acid in water; solution B was 95% (v/v) CH₃CN, 0.03% (v/v) trifluoroacetic acid in water. To minimize back exchange, the valves, trap column, and analytical column were cooled to 0 °C by immersion in an ice-water bath.

**MS Analyses**—The liquid chromatography tandem MS (LC-ESI-MS/MS) analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000+, Bruker Daltonics). The HPLC system was connected directly through a splitting T-piece to the ESI source of the spectrometer. The settings were described in detail in Rey *et al.* (23). Data were processed using Data-Analysis 3.0, and MS/MS spectra were searched with MASCOT against single protein data base containing bAnc1p sequence. All assignments were verified manually and by accurate mass

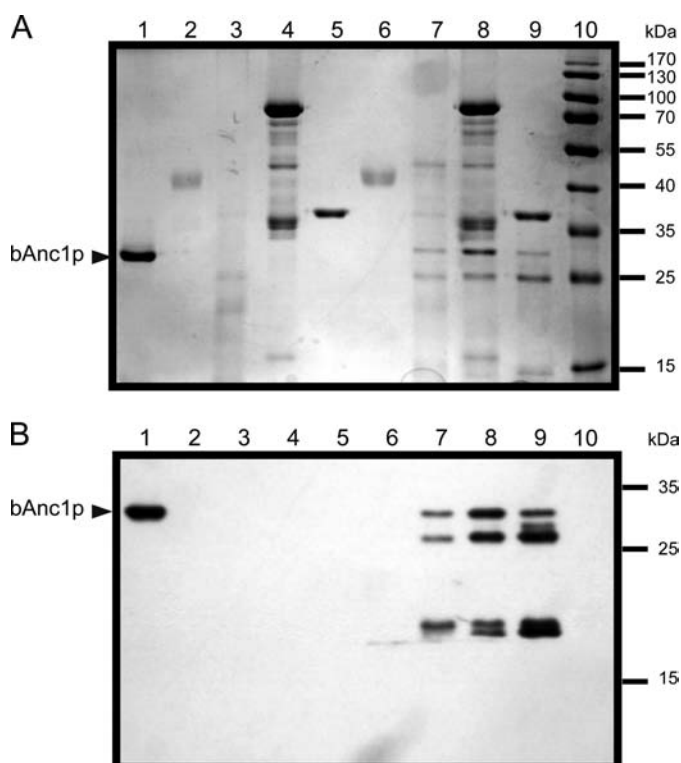
measurements. The analyses of deuterated samples and accurate mass measurements were done on a liquid chromatography electrospray time-of-flight MS (LC ESI-TOF-MS) 6210 system (Agilent Technologies). Isotope envelopes were extracted with Mass Hunter Qualitative Analyses software (Agilent Technologies), and the centroid of the isotopic distribution was measured with MagTran software (Zhongqi Zhang, Amgen, Thousand Oaks, CA) (27). Representation of carrier mapping was done with the DrawMap program available online as a part of the software suite MSTools.

## RESULTS

**Purification and Pepsin Digestion of the bAnc1p**—bAnc1p was isolated as a CATR- or BA-carrier complex in Triton X-100 (Fig. 2, lane 1) for which we found a suitable way of removal after the pepsin digestion step. Next, the purified complex was concentrated to a 5 mg/ml protein concentration leading to a detergent concentration close to 10% (w/v). Digestion of bAnc1p as a CATR-carrier complex was first assayed in solution in parallel experiments using three different acidic proteases, and the corresponding lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 2). Pepsin, protease type XIII, and protease type XVIII from Sigma were used at enzyme/bAnc1p ratios (w/w) of 1, 10, and 17, respectively (Fig. 2, lanes 6–8). The results showed unequivocally that pepsin was the most efficient protease to digest bAnc1p as no residual fragment of a size greater than 15 kDa was detected by SDS-PAGE after Coomassie Blue staining (Fig. 2A, lane 6) and Western blotting using antibodies raised against SDS-treated bAnc1p (Fig. 2B, lane 6). In contrast to pepsin, type XIII and type XVIII proteases were under our experimental conditions unable to digest the carrier completely, and large-size peptides were observed between 15 and 30 kDa (Fig. 2, lanes 7 and 8). Similar results were obtained with the BA-carrier complex (not shown). Increasing the protease/bAnc1p ratio did not significantly improve the digestion of the bovine carrier (not shown). The recombinant type XVIII protease, which we have characterized recently in our laboratory (16), was also evaluated but with no significant improvement (Fig. 2, lanes 9). Combinations of proteases were also tested without better success (not shown). Thus, only pepsin was used in the following experiments. As was shown previously, the use of immobilized proteases offers several advantages in HDX-MS experiments (16, 28, 29). Alongside higher protease stability and the absence of autodigestion, more important advantages are the much higher local concentration of protease leading to better digestion efficiency and the possible use of chaotropic reagent such as guanidinium chloride. Thus, to reach a fast, efficient, and highly reproducible digestion of bAnc1p, we performed online the proteolysis steps using a column packed with immobilized pepsin.

**Peptide Mapping of bAnc1p Covers Two-thirds of the Carrier**—We digested bAnc1p as a CATR- or BA-carrier complex as described above, and LC ESI-MS/MS analyses were performed. On the basis of the MS/MS spectra, we identified 56 peptides covering 94% of the protein sequence (23). An acetylserine at the N-terminal extremity and a trimethyllysine at position 51 were also identified. We did not detect phosphorylation of





**FIGURE 2. Proteolysis of bAnc1p.** Pepsin, type XIII, and type XVIII proteases (commercial and recombinant) were tested, and the corresponding lysates were analyzed by SDS-PAGE (12.5% acrylamide) and revealed by Coomassie Blue staining (A) or Western blot with anti-SDS-bAnc1p (B). Lanes 1–5, 2  $\mu$ g of bAnc1p, 2  $\mu$ g of pepsin, 26  $\mu$ g of type XIII protease, 32  $\mu$ g of commercial type XVIII protease, and 2  $\mu$ g of activated recombinant type XVIII protease were incubated in acidic buffer for 2 min at 4 °C. Lanes 6–9, digestion assays were performed with 2  $\mu$ g of bAnc1p and protease/substrate ratio of 1:1 (w/w) for pepsin, 10:1 (w/w) for type XIII protease, 17:1 (w/w) for commercial type XVIII protease, and 1:1 (w/w) for recombinant type XVIII protease in acidic buffer during 2 min at 4 °C, respectively. Lane 10, prestained molecular weight markers. The position of bAnc1p is indicated by an arrowhead.

bAnc1p tyrosines 190 and 194, in contrast to what has been described for isoforms 1 and 3 of the rodent ADP/ATP carrier (30–32). Thus, the bAnc1p primary amino acid sequence we determined was identical to the one obtained by Aquila *et al.* (33) and, therefore, to the one used to solve the three-dimensional structure of the CATR-bAnc1p complex (5). Protein coverage fell to 72% (37 peptides) in HDX-MS due to a low signal-to-noise or overlapping signals corresponding mainly to the C-terminal part of the carrier (Fig. 3). As a consequence, the N-terminal half of bAnc1p, covering residue 1–176, reached 100% sequence coverage with 32 peptides, some of them overlapping, thus, increasing the spatial resolution of the peptide regions mainly between residues 1 to 35 and residues 128 to 140 (Fig. 3). The other part of the carrier (from residues 177 to 297) presented lower sequence coverage (32%) with only 5 peptides. The digestion pattern gave six pairs of overlapping peptides that differed by only one residue, allowing us to get precise HDX information for the following individual amino acids: Cys⁵⁶, Phe¹²⁹, and Cys²⁵⁶ (Fig. 3).

**HDX Kinetics Performed on the CATR-Carrier Complex Correlate with the Three-dimensional Structure**—To monitor local HDX kinetics of individual parts of bAnc1p as a CATR-carrier complex, we digested the protein after 3–10,000 s of HDX.

Incubation times of 10, 300, 1,000, and 10,000 s were the most representative to show that the deuterium exchange agrees with the organization of the CATR-carrier complex in the detergent micelles (Fig. 4). As bAnc1p has a fold made up of about 70%  $\alpha$ -helix and 30% coil, H/D exchange kinetics vary according to the secondary structure. This information was taken into account in our analysis. The results obtained were unambiguous for the first half of the carrier. After only 10 s of HDX, region 1–35 fully covering helix H1 presents deuterium incorporation levels ranging from 14 to 70 % (Fig. 4). These results probably reflected a negative gradient of deuteration from the top to the bottom and can account for the funnel defined by the cavity evidenced in the three-dimensional structure of bAnc1p. Helices H2 (region 71–88) and H3 (118–140) presented behavior similar to that of helix H1 throughout the HDX experiment (Figs. 3 and 4). Moreover, we have shown that regions 20–35 (helix H1) and 110–140 (helix H3) remained strongly shielded from the deuteration (<40% of exchange) even after 10,000 s of HDX (Fig. 4). They include regions 31–35 and 130–135, which contain part of the MCF motif (Fig. 3). Based on the three-dimensional structure, the low HDX rates recorded for these two regions could be explained by their limited accessibility at the bottom of the cavity. Indeed, it should be remembered that H1 and H3 are longer and tightened to close the cavity via several salt bridges between conserved amino acid residues of the MCF motif (5). Interestingly, helix H2 was much less protected from deuteration (Fig. 4), which is consistent with its lower hydrophobicity as compared with helices H1 and H3 (34). Regions 1–8, 37–69, 89–108, and 142–159 (Fig. 3), corresponding to the N terminus, the matrix loop M1, a region including the C1 loop, and the N-terminal half of the matrix loop M2, respectively, are quickly and highly deuterated throughout the time course of the experiment (Fig. 4). Despite the presence of several secondary structures, these results would be consistent with exposure of these regions toward the solvent. In summary, the data collected from HDX account fully for the three-dimensional structure of the bovine carrier complexed to CATR in detergent.

**Conformational-dependent Accessibility of Cysteine Residues Analyzed by Local HDX Is in Agreement with Chemical Modification Data**—Three cysteine residues, Cys⁵⁶, Cys¹⁵⁹, and Cys²⁵⁶, are located at similar positions in the three matrix short  $\alpha$ -helical stretches h12, h34, and h56, respectively (Fig. 3). The fourth (Cys¹²⁸) is located in the helix H3. Chemical modifications of SH groups with *N*-ethylmaleimide or eosin-5-maleimide were used to probe conformational changes of bAnc1p (35–37). As confirmed by the three-dimensional structure, Cys¹²⁸ remained inaccessible to these reagents because its SH group is shielded by the peptide chain of helix H3. *N*-Ethylmaleimide was shown to target in mitochondria only Cys⁵⁶ in the presence of BA, whereas CATR prevented its labeling. This might be explained by the low solvent accessibility of Cys⁵⁶ in the CATR-carrier complex.

Pepsin digestion led to four pairs of overlapping peptides, *i.e.* 36–55/36–56, 128–134/129–134 or 128–135/129–135, and 248–255/248–256, which differed from each other by only one residue, *i.e.* Cys⁵⁶, Phe¹²⁹ (close to Cys¹²⁸), and Cys²⁵⁶, respectively (Fig. 3). We can, therefore, indirectly determine the deu-



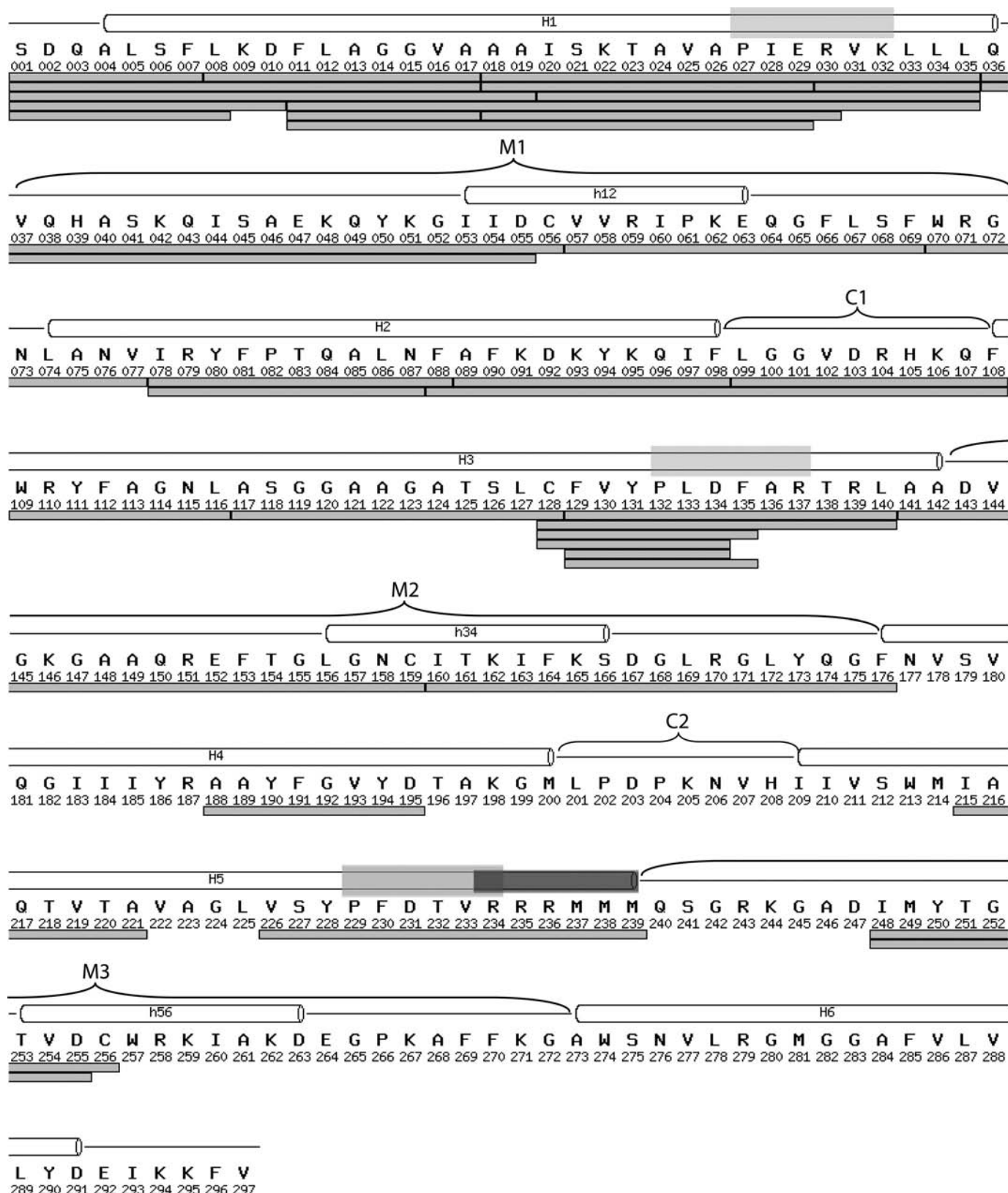


FIGURE 3. Peptide mapping of bAnc1p after immobilized-pepsin digestion used in HDX-MS experiments. All peptides were identified by ESI-Trap-MS/MS analyses and are represented under the amino acid primary sequence by light gray bars. Transmembrane helices (H1-H6), matrix loops (M1, M2, and M3), encompassing matrix helices (h12, h34, and h56), and IMS loops (C1 and C2) as found in the bAnc1p three-dimensional structure (see the legend of Fig. 1) are shown above the sequence. The PX(D/E)XX(K/R) sequence characteristic of mitochondrial carriers and the RRRMMM signature of the ADP/ATP carriers is indicated respectively as a transparent light gray and dark gray rectangles above the sequence.

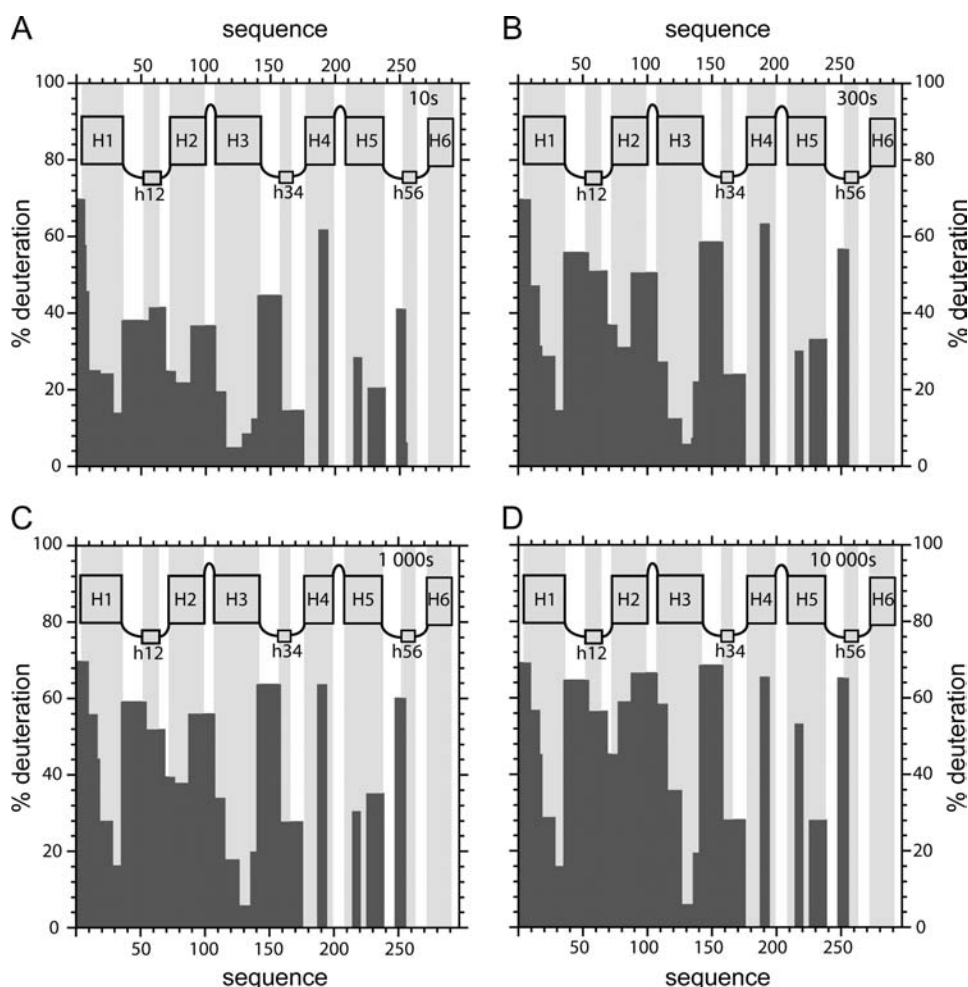


FIGURE 4. **Topography of bAnc1p-CATR complex revealed by HDX experiments.** Deuterium levels of peptides obtained from pepsin digestion of the bAnc1p-CATR complex after 10 (A), 300 (B), 1000 (C), and 10000 (D) seconds of HDX are plotted as black bars. Architecture of bAnc1p deduced from the three-dimensional structure (see legend of the Fig. 1) is shown in the panels (gray bars) in agreement with the primary sequence of bAnc1p.

teration rate of the amidic proton of these three amino acids according to the inhibitor used. Deuterium exchange kinetics for regions 37–56 and 249–256 depend on the complex analyzed (Fig. 5). An increase in exchange was observed for both regions in the BA-carrier complex. Analyses of the single residues Cys⁵⁶ and Cys²⁵⁶ amides showed a higher deuterium uptake in the presence of BA (Fig. 5, *insets*). In contrast, regions 129–134 and 129–135 were exchanged very slowly in both complex analyzed (Figs. 5 and 6). Deuterium incorporation in Phe¹²⁹ was, therefore, close to 0 (Fig. 5, *inset*). In summary, HDX-MS data obtained for the amidic proton of Cys⁵⁶ and for Phe¹²⁹ in detergent-solution corroborate the biochemical results published earlier about the labeling of the SH groups of Cys⁵⁶ and Cys¹²⁸ in the mitochondrial inner membrane (35, 37). Moreover, the better deuterium labeling of Cys⁵⁶ and Cys²⁵⁶ assessed by HDX kinetics in the BA-carrier complex suggests the unmasking of these residues to the solvent, which could be due to a repositioning of helices h12 and h56.

**Topography of the Matrix Loops in bAnc1p Complexed with Either CATR or BA as Assessed by HDX-MS Experiments**—Accessibility of the bAnc1p matrix loops to Lys- or Arg-specific proteases was previously investigated in our laboratory (25, 38).

Only the BA-carrier complex was cleaved in inside-out submitochondrial particles at Arg³⁰ and/or Arg⁵⁹, Lys⁴², Lys¹⁴⁶, and Lys²⁴⁴, the CATR-carrier complex being insensitive. These residues, except Arg³⁰, were located in the matrix loops identified in the three-dimensional structure of the CATR-bAnc1p complex (5).

Helix h12 contains Arg⁵⁹. Residues corresponding to Lys⁴², Lys¹⁴⁶, and Lys²⁴⁴ are located in the N-terminal part of matrix loops M1, M2, and M3, respectively. As we can see in Fig. 3, these parts of bAnc1p were covered partially or totally by the regions 37–56, 58–69, 142–159, and 249–256. Their level of deuterium was found to be quite high after 10,000s of HDX ( $\geq 50\%$  exchange) whatever the complex analyzed (Fig. 5), in agreement with their exposure to the solvent. However, consistent with the results described above, all these regions were more deuterium-exchanged in the BA-carrier complex than in the CATR-carrier complex (Fig. 5). Even though structural loss of the matrix helices could partly contribute to this increase of deuterium incorporation, our data provide evidence for the unmasking of the matrix loops (comprising unstructured regions) to the solvent. This

could be interpreted as the opening of the carrier toward the matrix in the BA-carrier complex.

**Transmembrane Helices Are Involved in the Conformational Dynamics of bAnc1p**—HDX experimental analyses gave insights into the conformational dynamics of helices H1, H2, and H3. Analysis of the N terminus of bAnc1p via the region 1–8 showed a strong and fast deuterium ( $>60\%$  exchange after only 30s) whatever the nature of the complex (Fig. 6). Nevertheless, there was a significant and reproducible time-lag delay in the deuterium of this region in the BA-carrier complex (Fig. 6). The differences in deuterium between the complexes increased in the first transmembrane segment. Indeed, regions 9–11, 12–17, and 18–19 localized in helix H1 presented higher and faster deuterium in the CATR-carrier complex, unlike the BA-carrier complex, which remained weakly deuterated throughout the time course of the experiment (Fig. 6). These results showed that the N-terminal half of helix H1 is much less exposed to the solvent in the BA-carrier complex. Conversely, the C-terminal half of helix H1, which contains the first MCF signature motif (regions 21–30 and 31–35), is more deuterated in the presence of BA (Fig. 6). Helix H3 exhibited behavior similar to that of helix H1 with respect to its level of deuterium

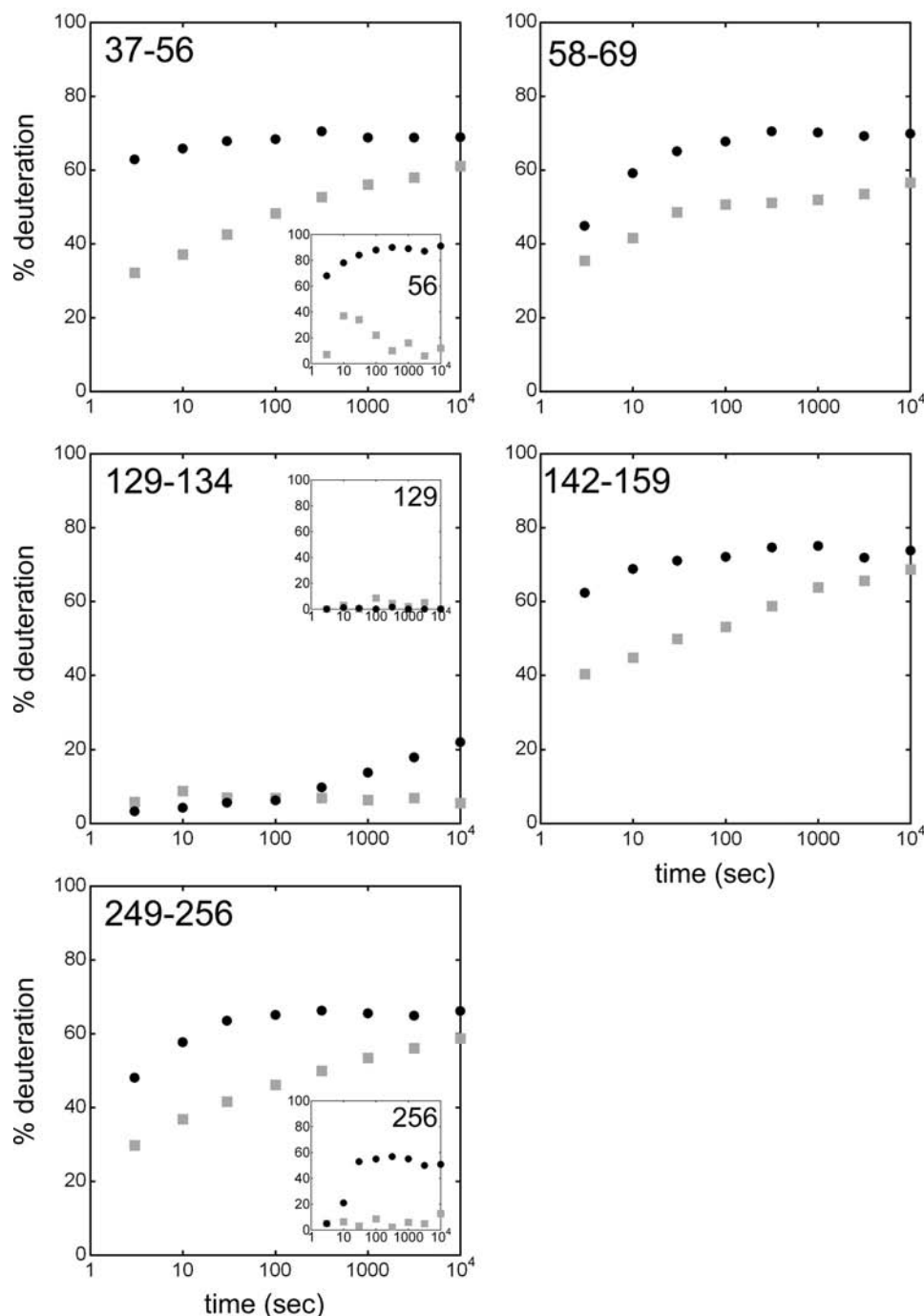


FIGURE 5. **HDX kinetics for bAnc1p matrix loops.** The time units for the HDX kinetics are in seconds. Deuterium exchange is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level. HDX kinetics are in gray-filled squares (CATR-carrier complex) and black-filled circles (BA-carrier complex). *Inset*, HDX kinetics for amide proton 56 (Cys⁵⁶), 129 (Phe¹²⁹), and 256 (Cys²⁵⁶) deduced from the couples of overlapping peptides 36–55/36–56, 128–134/129–134 and 248–255/248–256, respectively.

in both complexes. The N-terminal half of helix H3 covered by regions 110–116 and 118–128 was more accessible to the solvent in the CATR-carrier complex than in the BA-carrier complex (Fig. 6). Opposite results were found for the C-terminal half, which contains the second MCF signature motif, *i.e.* the regions 129–135 and 136–140 (Fig. 6).

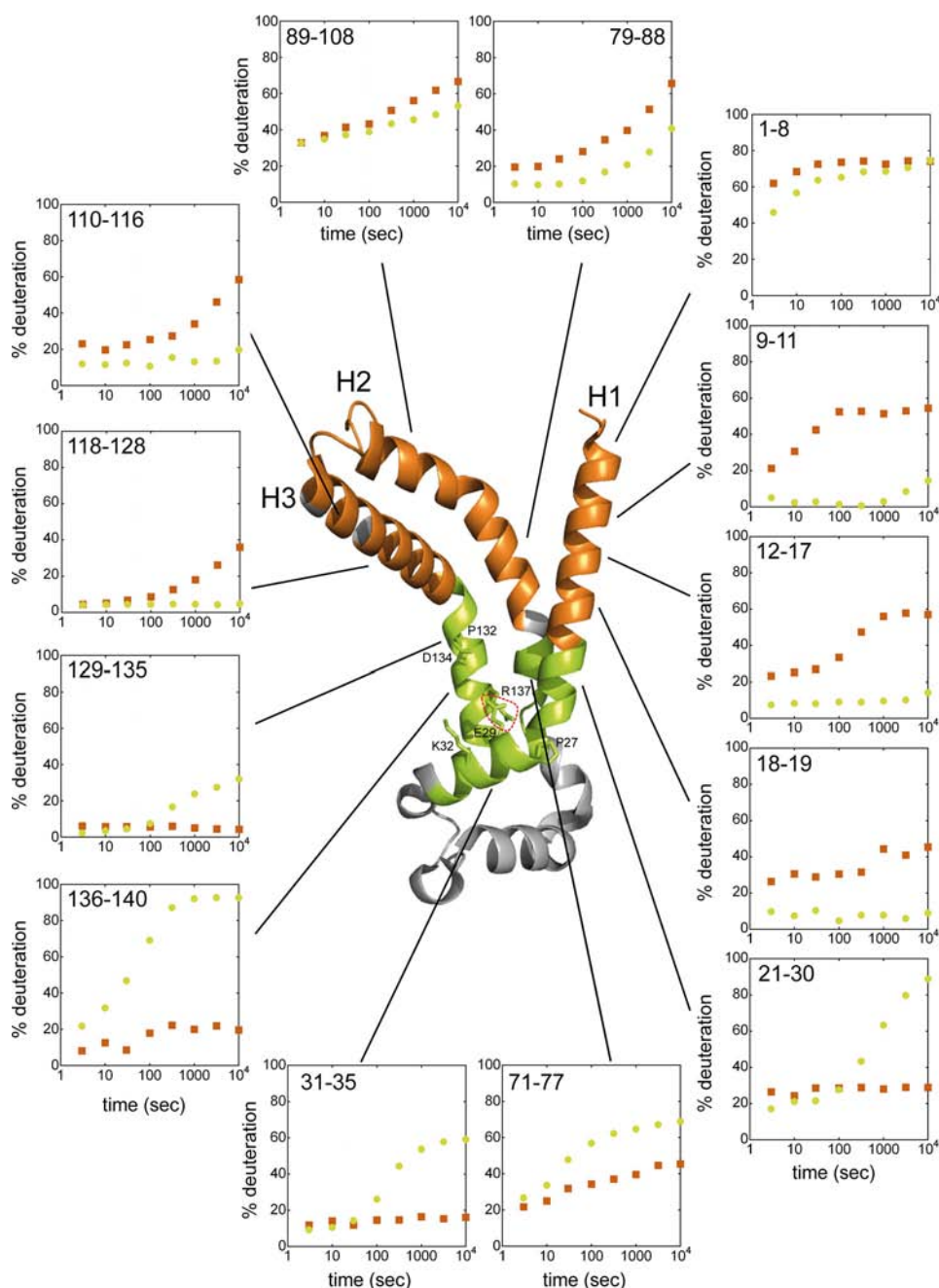
Helix H2, which is shorter than helices H1 and H3, was covered in our experiment by regions 71–77, 79–88, and 89–108 (Fig. 3). The first region, which corresponds to the N-terminal

part of helix H2, was more deuterated in the BA-carrier complex than in the CATR-carrier complex (Fig. 6). Moreover, the deuteration of region 79–88 was higher in the CATR-carrier complex than in the BA-carrier complex (Fig. 6). Detailed analyses of region 89–108 were hampered by its length (20 amino acids) and by the presence of two secondary structures, *i.e.* a  $\alpha$ -helix (the C-terminal half of the helix 2) and the C1 loop. However, for incubation times longer than 100 s, this region was overall more deuterated in the CATR-carrier complex than in the BA-carrier complex (Fig. 6). Consequently, helices H1, H2, and H3 display similar behaviors in the conformational dynamics of bAnc1p in Triton-X100 micelles; first, the regions of these three helices toward the IMS were much more deuterated in the CATR-carrier complex than in the BA-carrier complex (Fig. 6), and second, the deuterium exchange reversal evidenced in regions 21–30, 71–77, and 129–135, was localized at the level of the salt bridges that close the cavity in the CATR-carrier complex (Fig. 6).

The parts of the carrier corresponding to helices H5 and H4 were covered by two peptides and one peptide, respectively (Fig. 3). As reported for helices H1 and H3, the N-terminal half of helix H5, covered partially by region 216–221, presented higher deuteration incorporation throughout the time course of the experiment in the CATR-carrier complex than in the BA-carrier complex (supplement Fig. 1). Surprisingly, the region 227–239 corresponding to the third MCF motif and to the Ancp signature was characterized by a low accessibility to the solvent (~20–30% exchange) in

both complexes (supplement Fig. 1). Thus, this signature motif behaves differently from that of the first two. Furthermore, no difference in solvent accessibility was found after 100 s of HDX for the region 189–195, which corresponds to the C-terminal half of helix H4 (supplement Fig. 1). These two regions do not appear to undergo conformational or accessibility changes. The same suggestion holds for region 161–176, which covers the C-terminal half of the matrix loop M2, just before helix H4 (supplement Fig. 1).





**FIGURE 6. HDX kinetics for bAnc1p helices H1 to H3 mapped on the crystal structure of bAnc1p complexed to CATR.** The orange ribbons represent the regions covered by eight peptides showing that the CATR-carrier complex is more exposed to the solvent than the BA-carrier complex at 300 s of HDX, and vice versa for the green ribbon diagrams corresponding to five other regions. Transmembrane  $\alpha$ -helices are labeled, and the linker region connecting helices H1 to H2 (loop M1) is colored in gray. Residues involved in the MCF signature motives (Pro²⁷, Glu²⁹, Lys³², Pro¹³², Asp¹³⁴, and Arg¹³⁷) are labeled. The salt bridge Glu²⁹-Arg¹³⁷ involved in stabilizing the bottom of the cavity is surrounded by red dots. Time units for the HDX kinetics are in seconds. HDX is expressed as percentages relative to the maximum theoretical deuteration level. HDX kinetics for regions coming from the CATR- and the BA-carrier complexes are in orange-filled squares and green-filled circles, respectively.

## DISCUSSION

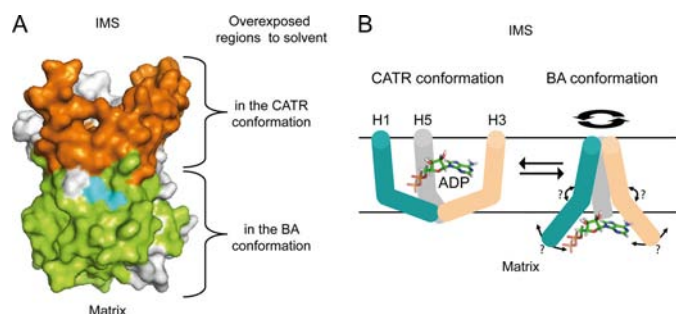
The physiological role of Ancp is to export ATP from the mitochondria in exchange for external ADP. Transport takes place once ADP binds to a monomer from the outside and ATP to another monomer from the inside (39). During the transport mechanism, the carrier switches between two different conformations that can be blocked by two toxins: CATR and BA.

Therefore, our understanding of the nucleotide transport mechanism can be improved by studying the structural differences between the individual inhibited states. The three-dimensional structure of bAnc1p complexed to CATR shows a cavity that is only accessible from the outside (5). It was suggested that CATR binding occurs at a site identical to or overlapping the ADP-binding site, thus preventing ADP/ATP transport (5). In this work we investigated the bAnc1p conformer complexed to BA using the HDX-MS approach. It was possible to gain insights into the BA-bAnc1p complex by comparing the deuteration levels and kinetics of both complexes.

The large body of evidence available in the literature is consistent with the idea that the CATR- and the BA-carrier complexes correspond to different conformations of the protein (2). However, it is now accepted that the two conformers inserted in the membrane or in detergent solution have basically a similar three-dimensional structure formed by six transmembrane helices and three short helices toward the solvent. The CATR- and the BA-bAnc1p complexes solubilized in Triton X-100 are predominantly monomeric as assessed recently by analytical ultracentrifugation sedimentation velocity experiments (40). Therefore, our results are discussed assuming monomeric structures.

Analysis of our results shows that in the BA-carrier complex, the IMS-exposed side was less accessible than the matrix-exposed side. A reverse situation is observed for the CATR-carrier complex (Fig. 7A). These results might reflect a slight translocation motion of bAnc1p in the membrane, as was suggested 30 years ago from freeze-fracture electron microscopy experiments (26) and more recently from immuno-

logical and biochemical data obtained with bAnc1p (25) and ScAnc2p (41, 42). Therefore, the transition from the CATR conformation to the BA conformation, trapping the inhibitors, might be related to a pulling motion of Ancp toward the matrix in presence of BA, the regions of bAnc1p facing the IMS becoming partially buried in the phospholipid bilayers in the BA conformation. The reverse motion would occur when the



**FIGURE 7. Topography of bAnc1p as assessed by HDX-MS after 300 s of deuteration and ADP-dependent structural transition between conformers.** *A*, the regions exposed to the solvent in the CATR- or in the BA-carrier complexes are colored in orange or in green, respectively. The regions that display no differences in the deuteration level whatever complex analyzed and the uncovered regions are shown in gray. Conserved signature motives PX(D/E)XX(K/R) are in cyan. *B*, shown is a hypothetical model of ADP transport mechanism across the mitochondrial inner membrane from the IMS to the matrix mimicked by the BA and CATR conformations. Only the odd-numbered helices are drawn for the sake of clarity, and ADP is represented in stick. ADP is trapped in the cavity of the CATR conformation closed from the matrix side. As a diaphragm, the N-terminal half of the helices H1 (blue), H3 (gray), and H5 (pink) might associate in the BA conformation to close the cavity toward the IMS as a peptide plug. Opening the cavity toward the matrix would then be performed via an undetermined movement of C-terminal half of the odd-numbered helices, thus, breaking the salt bridges, repositioning the matrix loops, and finally, releasing the ADP.

carrier adopts the CATR conformation. However, this mechanistic model hardly explains why the peptide regions of ScAnc2p equivalent to the loops C1 and C2 facing the IMS in bAnc1p are easily accessible to the solvent in mitochondria in an inhibitor-independent manner (41, 42). Thus, the transition from one conformation to another is probably more complex and not confined to this simple phenomenon.

The study described in this paper affords new insights into the conformational transition of bAnc1p. First, it is consistent with the fact that in the CATR conformation the cavity defines a deep cone-shaped depression open only to the IMS. This explains why an increasing gradient of deuteration is observed in this complex for helices H1, H2, and H3 from bottom to top of the cavity. Thus, as we can expect, regions 21–35 (helix H1), 129–140 (helix H3), and 227–239 (helix H5), encompassing the three MCF signature motives, were weakly deuterated in the CATR-carrier complex because of their localization at the bottom of the cavity, which is also closed from the matrix side by a peptide plug of 10 Å (5). Such a gradient of deuteration was not observed in the case of the BA-carrier complex. We showed that the regions of helices H1, H2, H3, and H5 toward the IMS were overall much less open in the BA-carrier complex than in the CATR-carrier complex. These results are in agreement with the lower accessibility to SH reagents of the C-terminal and N-terminal ends of helices H2 and H5 in the BA-ScAnc2p complex assessed by cysteine scanning (41, 42). Taken together, these results suggest a coordinated movement of at least four of the six transmembrane segments hypothesized to close the cavity from the IMS. The limited deuteration ( $\leq 20\%$  exchange) measured throughout regions 9–19 (helix H1), 110–128 (helix H3), and 216–221 (helix H5) suggests in the structure of the BA-carrier complex the presence of a peptide plug of  $\sim 15$  Å, isolating the cavity from the IMS. However, we have no evidence on the formation of a second network of salt bridges to

stabilize the closure of the cavity in the BA conformation as recently proposed (43). Moreover, our data do not seem consistent with the presence in the BA-carrier complex of a cavity similar to that of the CATR-carrier complex but open toward the matrix (44).

Regions 21–35 (helix H1) and 129–140 (helix H3) encompassing the first two MCF motives were much more deuterated in the BA-carrier complex than in the CATR-carrier complex, unlike regions 1–19 (Helix H1) and 110–128 (Fig. 6). These results strongly suggest intramolecular rearrangements of helices H1 and H3, underlining a pivotal role of the first two signature motives in the opening and closing mechanism of the cavity mimicked by the inhibitor-carrier complexes (Fig. 7A). Interestingly, helix H5 distinguishes from the other odd-numbered helices. Indeed, unlike its N-terminal half, which presented a similar behavior to that of helices H1 and H3, the C-terminal half showed a similar accessibility to the solvent whatever the complex analyzed. Although its analysis is limited to two peptide regions (Fig. 3), we can hypothesize that helix H5, which displays the conserved signature RRRMMM of the Ancp, is less flexible than the first three helices H1 to H3 during the conformational transition of the carrier. This hypothesis is reinforced by its greater rigidity compared with the five others helices in bAnc1p, as assessed by the recent molecular dynamics simulation studies performed on the opening of bAnc1p toward the matrix during the ADP transport (45).

In summary, our results are in agreement with conformational movements of the odd-numbered helices, first locking the cavity from the IMS side by a peptide plug and then opening it on the matrix side in the BA conformer and vice versa in the CATR conformer, leading to ADP translocation as depicted in Fig. 7B. This mechanism may be coupled to the disruption of the salt bridge network at the bottom of the cavity in the CATR conformer. As previously hypothesized by Brandolin and co-workers (5), a change would occur in the bend angles that defines the degree of straightening of the odd-numbered helices supported by the presence of conserved prolines in the MCF motives, which could act as hinges. More recently, the structural dynamics of the ADP/ATP carrier revealed by molecular dynamics simulation studies showed that prolines also provide a hinge wobbling motion of the odd numbered helices (46). This suggests a more complex mechanism to close and open the cavity that we could liken to the movement of a diaphragm (Fig. 7B).

The mobility of the three loops connecting the transmembrane helices on the matrix side in bAnc1p seems to be especially high. This was already suggested from probing their basic and cysteine residues (25, 35–38). Our results underline a concomitant rearrangement of loops M1 to M3 in presence of BA for a better solvent accessibility of the cavity to the matrix. Interestingly, amide protons of Cys⁵⁶ and Cys²⁵⁶ localized in helices h12 and h56, respectively, present a higher deuteration level in the BA-carrier complex. These two short helices probably have a similar position in the matrix but are different enough to allow the only labeling of Cys⁵⁶, and not that of Cys²⁵⁶, by *N*-ethylmaleimide or eosin-5-maleimide (35, 37). This observation probably deviates from a symmetrical positioning of helices h12 and h56 with respect to the solvent in the

BA-carrier complex, unlike what is described for the CATR-carrier complex (5).

In conclusion, we describe for the first time the study of bAnc1p, a member of the MCF, by HDX-MS, providing new insights into the conformational dynamics of the ADP/ATP carrier through the analysis of the two conformers trapped by CATR and BA. Our results are consistent for the bovine carrier with an ADP translocation mechanism from the IMS to the matrix in which the intrinsic flexibility of the odd-numbered helices would be coupled to a conformational transition of the matrix loops leading to an opening of the cavity toward the matrix. A closing of the cavity on the IMS side is proposed to explain the limited deuterium incorporation of bAnc1p toward this mitochondrial compartment in the BA conformation (Fig. 7B). This step is an important prerequisite to allowing the substrate to cross the membrane without leakage of protons. Although our model sheds light on some features of the ADP/ATP mechanism via the comparative study of the BA and the CATR conformations, the transport mechanism itself and the organization of bAnc1p in the membrane need additional investigation. In this context the study of the conformational dynamics of the carrier in mitochondria in the presence of substrates translocated or not across the mitochondrial inner membrane would be a major step forward.

## REFERENCES

- Walker, J. E., and Runswick, M. J. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 435–446
- Klingenberg, M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1978–2021
- Klingenberg, M. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 1–14
- Trézéguet, V., Pélosi, L., Lauquin, G. J., and Brandolin, G. (2008) *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 435–443
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J., and Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39–44
- Wales, T. E., and Engen, J. R. (2006) *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 158–170
- Redfield, C. (2004) *Methods Mol. Biol.* **278**, 233–254
- Krishna, M. M., Hoang, L., Lin, Y., and Englander, S. W. (2004) *Methods* **34**, 51–64
- Pinheiro, T. J., Cheng, H., Seeholzer, S. H., and Roder, H. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**, 617–626
- Halskau, Ø., Frøystein, N. A., Muga, A., and Martínez, A. (2002) *J. Mol. Biol.* **321**, 99–110
- Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N. A., Gèze, A., Guillaian, F., Gillet, D., and Forge, V. (2005) *J. Mol. Biol.* **349**, 890–905
- Man, P., Montagner, C., Vernier, G., Dublet, B., Chenal, A., Forest, E., and Forge, V. (2007) *J. Mol. Biol.* **368**, 464–472
- Hsu, Y. H., Burke, J. E., Li, S., Woods, V. L., Jr., and Dennis, E. A. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 23652–23661
- Burke, J. E., Karbarz, M. J., Deems, R. A., Li, S., Woods, V. L., Jr., and Dennis, E. A. (2008) *Biochemistry* **47**, 6451–6459
- Burke, J. E., Hsu, Y. H., Deems, R. A., Li, S., Woods, V. L., Jr., and Dennis, E. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31227–31236
- Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E., and Pelosi, L. (2009) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3431–3438
- Mazon, H., Marcillat, O., Forest, E., and Vial, C. (2005) *Biochimie* **87**, 1101–1110
- Cravello, L., Lascoux, D., and Forest, E. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2387–2393
- Joh, N. H., Min, A., Faham, S., Whitelegge, J. P., Yang, D., Woods, V. L., and Bowie, J. U. (2008) *Nature* **453**, 1266–1270
- Busenlehner, L. S., Codreanu, S. G., Holm, P. J., Bhakat, P., Hebert, H., Morgenstern, R., and Armstrong, R. N. (2004) *Biochemistry* **43**, 11145–11152
- Zhang, X., Chien, E. Y., Chalmers, M. J., Pascal, B. D., Gatchalian, J., Stevens, R. C., and Griffin, P. R. (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1100–1108
- Hebling, C. M., Morgan, C. R., Stafford, D. W., Jorgenson, J. W., Rand, K. D., and Engen, J. R. (2010) *Anal. Chem.* **82**, 5415–5419
- Rey, M., Mrázek, H., Pompach, P., Novák, P., Pelosi, L., Brandolin, G., Forest, E., Havlicek, V., and Man, P. (2010) *Anal. Chem.* **82**, 5107–5116
- Lauquin, G. J., and Vignais, P. V. (1976) *Biochemistry* **15**, 2316–2322
- Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P., and Vignais, P. V. (1989) *Biochemistry* **28**, 1093–1100
- Brandolin, G., Doussiere, J., Gulik, A., Gulik-Krzywicki, T., Lauquin, G. J., and Vignais, P. V. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **592**, 592–614
- Zhang, Z., and Marshall, A. G. (1998) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 225–233
- Wu, Y., Kaveti, S., and Engen, J. R. (2006) *Anal. Chem.* **78**, 1719–1723
- Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J., and Morrow, J. A. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1041–1046
- Lewandrowski, U., Sickmann, A., Cesaro, L., Brunati, A. M., Toninello, A., and Salvi, M. (2008) *FEBS Lett.* **582**, 1104–1110
- Feng, J., Zhu, M., Schaub, M. C., Gehrig, P., Roschitzki, B., Lucchinetti, E., and Zaugg, M. (2008) *Cardiovasc. Res.* **80**, 20–29
- Feng, J., Lucchinetti, E., Enkavi, G., Wang, Y., Gehrig, P., Roschitzki, B., Schaub, M. C., Tajkhorshid, E., Zaugg, K., and Zaugg, M. (2010) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C740–C748
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M. (1982) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 345–349
- Saraste, M., and Walker, J. E. (1982) *FEBS Lett.* **144**, 250–254
- Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y. M., and Terada, H. (1994) *Biochemistry* **33**, 9530–9536
- Majima, E., Koike, H., Hong, Y. M., Shinohara, Y., and Terada, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181–22187
- Boulay, F., and Vignais, P. V. (1984) *Biochemistry* **23**, 4807–4812
- Marty, I., Brandolin, G., Gagnon, J., Brasseur, R., and Vignais, P. V. (1992) *Biochemistry* **31**, 4058–4065
- Block, M. R., and Vignais, P. V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 369–376
- Nury, H., Manon, F., Arnou, B., le Maire, M., Pebay-Peyroula, E., and Ebel, C. (2008) *Biochemistry* **47**, 12319–12331
- Kihira, Y., Majima, E., Shinohara, Y., and Terada, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 184–192
- Iwahashi, A., Kihira, Y., Majima, E., Terada, H., Yamazaki, N., Kataoka, M., and Shinohara, Y. (2006) *Mitochondrion* **6**, 245–251
- Robinson, A. J., Overy, C., and Kunji, E. R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 17766–17771
- Palmieri, F., and Pierri, C. L. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 1931–1939
- Wang, Y., and Tajkhorshid, E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9598–9603
- Falconi, M., Chillemi, G., Di Marino, D., D'Annese, I., Morozzo della Rocca, B., Palmieri, L., and Desideri, A. (2006) *Proteins* **65**, 681–691



## Résumé

---

Les transporteurs d'ADP/ATP (Ancp) et de phosphate inorganique (PiC) ainsi que la porine VDAC représentent les principaux maillons d'une machinerie de transport d'ADP, d'ATP et de phosphate inorganique à travers la double membrane mitochondrial. Actuellement, les connaissances relatives aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette machinerie accusent un retard. L'objectif de ce projet de Thèse a été d'amener de nouveaux éléments sur l'état conformationnel de ces protéines étudiées dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, modèle biologique où la génétique est facilitée.

La majeure partie de ce projet a concerné l'Ancp de levure qui assure l'échange d'ADP cytosolique contre de l'ATP matriciel néosynthétisé suite aux processus de phosphorylation oxydative. Il peut être inhibé spécifiquement par deux poisons naturels, le carboxyatractyloside (CATR) et l'acide bongkréique (BA) qui stabilisent la protéine dans deux états conformationnels distincts adoptés lors du mécanisme de transport. Afin de mieux comprendre cette dynamique, une étude comparative des deux conformères a été réalisée en combinant l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) aux outils biochimiques directement liés à l'étude des Ancp. Les résultats obtenus corréleront l'hypothèse d'une structure malléable du transporteur dans laquelle des changements conformationnels importants interviennent. D'autre part, ce projet a permis d'obtenir les premières données d'accessibilité au solvant du PiC. Enfin, l'étude en HDX-MS de VDAC, nous a permis de montrer que son accessibilité au solvant en solution de détergent était en accord avec les données structurales publiées récemment.

The ADP/ATP (Ancp) and phosphate inorganic (PiC) carriers as well as the VDAC porin catalyze import and export of ADP, ATP and Pi across the mitochondrial membranes. Characterization of this mechanism at the molecular level is not well understood. The main goal of this work concerns the study of the conformational state of these proteins in detergent solution purified from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where the genetic is easier.

The major part of this project concerned the Ancp located in the inner mitochondrial membrane that catalyzes the transmembrane exchange of ADP and ATP between the cytosolic and the matrix compartments. ADP/ATP transport is achieved by interconversion of Ancp between two conformational states that are fixed by the specific transport inhibitors carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid (BA). Conformational dynamics of the Ancp was investigated by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS). The data were compared to those obtained using molecular and biochemical approaches. Our results suggest a flexible structure of the carrier and a real synergy between each side of the carrier during the transport mechanism of nucleotides. On the other hand, these work provided the first data about the solvent accessibility of PiC. Finally, the study of VDAC in HDX-MS allowed us to show that its solvent accessibility in detergent solution corroborated the structural data published previously.

---

**Mots clefs:** transporteur d'ADP/ATP, transporteur de phosphate, VDAC, CATR, CATR, BA, échange H/D, spectrométrie de masse, levure, *Sacharomyces cerevisiae*.





## Résumé

---

Les transporteurs d'ADP/ATP (Ancp) et de phosphate inorganique (PiC) ainsi que la porine VDAC représentent les principaux maillons d'une machinerie de transport d'ADP, d'ATP et de phosphate inorganique à travers la double membrane mitochondrial. Actuellement, les connaissances relatives aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette machinerie accusent un retard. L'objectif de ce projet de Thèse a été d'amener de nouveaux éléments sur l'état conformationnel de ces protéines étudiées dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, modèle biologique où la génétique est facilitée.

La majeure partie de ce projet a concerné l'Ancp de levure qui assure l'échange d'ADP cytosolique contre de l'ATP matriciel néosynthétisé suite aux processus de phosphorylation oxydative. Il peut être inhibé spécifiquement par deux poisons naturels, le carboxyatractyloside (CATR) et l'acide bongkréique (BA) qui stabilisent la protéine dans deux états conformationnels distincts adoptés lors du mécanisme de transport. Afin de mieux comprendre cette dynamique, une étude comparative des deux conformères a été réalisée en combinant l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) aux outils biochimiques directement liés à l'étude des Ancp. Les résultats obtenus corréleront l'hypothèse d'une structure malléable du transporteur dans laquelle des changements conformationnels importants interviennent. D'autre part, ce projet a permis d'obtenir les premières données d'accessibilité au solvant du PiC. Enfin, l'étude en HDX-MS de VDAC, nous a permis de montrer que son accessibilité au solvant en solution de détergent était en accord avec les données structurales publiées récemment.

The ADP/ATP (Ancp) and phosphate inorganic (PiC) carriers as well as the VDAC porin catalyze import and export of ADP, ATP and Pi across the mitochondrial membranes. Characterization of this mechanism at the molecular level is not well understood. The main goal of this work concerns the study of the conformational state of these proteins in detergent solution purified from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where the genetic is easier.

The major part of this project concerned the Ancp located in the inner mitochondrial membrane that catalyzes the transmembrane exchange of ADP and ATP between the cytosolic and the matrix compartments. ADP/ATP transport is achieved by interconversion of Ancp between two conformational states that are fixed by the specific transport inhibitors carboxyatractyloside (CATR) and bongkreic acid (BA). Conformational dynamics of the Ancp was investigated by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS). The data were compared to those obtained using molecular and biochemical approaches. Our results suggest a flexible structure of the carrier and a real synergy between each side of the carrier during the transport mechanism of nucleotides. On the other hand, these work provided the first data about the solvent accessibility of PiC. Finally, the study of VDAC in HDX-MS allowed us to show that its solvent accessibility in detergent solution corroborated the structural data published previously.

---

**Mots clefs:** transporteur d'ADP/ATP, transporteur de phosphate, VDAC, CATR, CATR, BA, échange H/D, spectrométrie de masse, levure, *Sacharomyces cerevisiae*.